Spezifische Modifizierung von Transfer-Ribonucleinsäuren mit Natriumborhydrid

Tibor Igo-Kemenes

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0011

Spezifische Modifizierung von Transfer-Ribonucleinsäuren mit Natriumborhydrid

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Tibor Igo-Kemenes
aus Pecs-Ungarn

München 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 1971

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit vom September 1967 bis Juli 1970 ausgeführt.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau,
European J. Biochem. 10 (1969) 549.

T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau,
European J. Biochem. (im Druck)

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit. Den Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	6
2.	Analyse der Transfer-Ribonucleinsäuren nach Behandlung mit Natriumborhydrid	14
2.1	Reduktionsgeschwindigkeit seltenen Nucleoside in unfraktionierter und Serin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure	14
2.2	Quantitative Auswertung der Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid	16
2.3	Photometrische Dihydrouridin-Bestimmung in Transfer-Ribonucleinsäure	18
2.4	Oligonucleotidanalyse von Serin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid und Spaltung mit T1-Ribonuclease und alkalischer Phosphatase	18
2.5	Oligonucleotidanalyse von Tyrosin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid und Spaltung mit T1-Ribonuclease	23
2.6	Reduktion von Phenylalanin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure und von Fragmenten mit Natriumborhydrid	26
2.6.1	Oligonucleotidanalyse von Phenylalanin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid und Spaltung mit T1-Ribonuclease	26
2.6.2	Geschützte Nucleoside in der Phenylalanin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure. Untersuchungen über die Reduzierbarkeit von 1-Methyladenosin in der intakten Transfer-Ribonucleinsäure sowie in Fragmenten	28
2.6.3	Geschützte Nucleoside in der Phenylalanin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure. Untersuchungen über die Reduzierbarkeit von 7-Methylguanosin in der intakten Transfer-Ribonucleinsäure sowie in Fragmenten	35
2.7	Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der dreidimensionalen Struktur der Transfer-Ribonucleinsäure	41

3.	Biologische Aktivitäten von Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit Natriumborhydrid	44
3.1	Aminosäure-Akzeptoraktivität	44
3.2	Bindungsaktivität an das Ribosom	51
3.3	Transferaktivität	51
3.4	Cytidin-5'-Phosphat- und Adenosin-5'-Phosphat-Einbauaktivität von Transfer-Ribonucleinsäure nach limitiertem Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase	53
3.5	Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Enzym-Erkennungsregionen der Transfer-Ribonucleinsäuren	55
4.	Beschreibung der Versuche	59
4.1	Materialien	59
4.2	Apparative Hilfsmittel	61
4.3	Methoden	62
4.3.1	Vorbereitung von Austauscherharzen	62
4.3.2	Anreicherung von Tyrosin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure	63
4.3.3	Reduktion von Transfer-Ribonucleinsäure oder von Fragmenten der Transfer-Ribonucleinsäure mit Natriumborhydrid	65
4.3.4	Reinigung von Transfer-Ribonucleinsäure und Fragmenten der Transfer-Ribonucleinsäure nach Behandlung mit Natriumborhydrid	66
4.3.5	Spektrophotometrische Verfolgung der Reduktion von 7-Methylguanosin	67
4.3.6	Oligonucleotidanalyse	67
4.3.6.1	Enzymatische Spaltung von Transfer-Ribonucleinsäure und von Fragmenten	67
4.3.6.2	Säulenchromatographie von Oligonucleotiden	68
4.3.6.3	Isolierung von Oligonucleotiden aus Säuleneluaten	69

4.3.6.4	Papierelektrophorese und Papierchromatographie	69
4.3.7	Biologische in vitro Tests	70
4.3.7.1	Aminoacylierung von Transfer-Ribonucleinsäure	70
4.3.7.2	Ribosomen-Bindungstest	70
4.3.7.3	Poly(U,C)-stimulierter Einbau von ^{14}C-Serin in Polypeptid	71
4.3.7.4	Einbau von Adenosin- und Cytidin-5'-Phosphat in die 3'-terminalen Positionen von Transfer-Ribonucleinsäure	71
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
6.	Literaturverzeichnis	77
7.	Abkürzungsverzeichnis	82

1. Einleitung und Problemstellung

Die genetische Information ist als eine lineare Folge von Basentripletts in Nucleinsäure festgelegt (1) und muß zur Verwirklichung der Genaktivität in eine lineare Folge von Aminosäuren im Protein übersetzt werden (2). Die Moleküle, die als Übersetzer dieser Information dienen, sind die Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs). Ihrer Aufgabe entsprechend erfüllen sie zwei wichtige Funktionen, die sie sehr selektiv (3-5) ausüben:

1. Eine tRNA akzeptiert eine der 20 Aminosäuren spezifisch über eine energiereiche Esterbindung (und führt diese aktivierte Aminosäure an den Ort der Proteinbiosynthese, den Matrizen-RNA-Ribosomen-Komplex).
2. Die Aminoacyl-tRNA wird an diesen Komplex spezifisch gebunden, wenn ein entsprechendes Codewort auf der Matrize diese Bindung stimuliert. (Nach der Bindung erfolgt die Übertragung (Transfer) der Aminosäure in das Protein, wonach die tRNA wieder frei wird.)

Die Spezifität dieser beiden Funktionen der tRNA, der Akzeptorfunktion und der Bindungsfunktion, wird durch spezifische Erkennungsmechanismen bewirkt.

Der Mechanismus der Code-Erkennung konnte weitgehend aufgeklärt werden (Übersicht: 6-8). In allen tRNAs gibt es in homologen Positionen eine Trinucleotidsequenz (Anticodon), die komplementär zum Codon der entsprechenden Aminosäure auf der Matrize ist (Abb. 1). Die Erkennung erfolgt dadurch, daß sich zwischen den komplementären Trinucleotidsequenzen der Matrize und dem Anticodon Wasserstoffbrücken ausbilden, die zu der spezifischen Wechselwirkung der Matrizen-RNA und der tRNA führen (9). Es ist in gutem Einklang mit der heutigen Anschauung über die Codon-Anticodon-Wechselwirkung, daß ein Austausch einer einzigen Base im Anticodon einer tRNA (wie z.B. in der Suppressor-$tRNA^{Tyr}_{coli}$ (10))

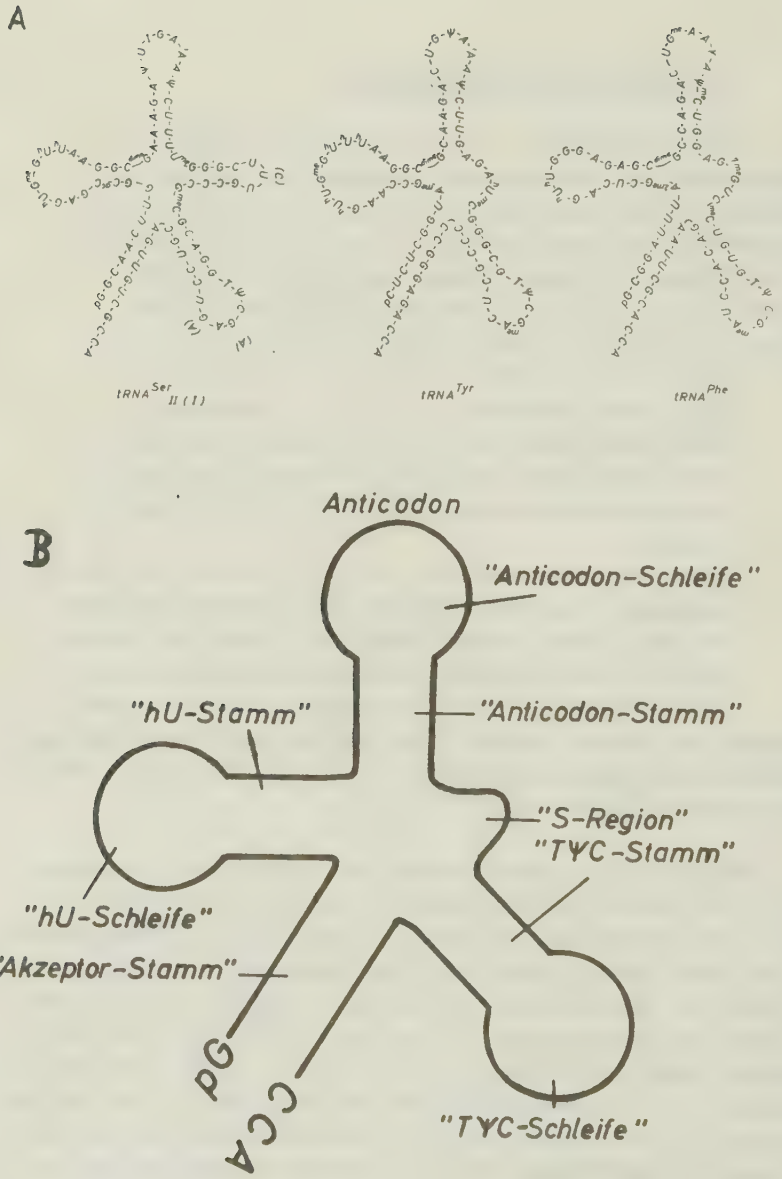


Abbildung 1: Kleeblattmodelle von Transfer-Ribonucleinsäuren aus Hefe (A) und das allgemeine Kleeblattmodell (B).

zu einer Veränderung der Code-Spezifität führen kann. Es ist offensichtlich, daß eine begrenzte und heute bereits gut charakterisierte Erkennungsregion (Anticodon) für die spezifische Code-Erkennung der tRNA verantwortlich ist (Übersicht: Ref. 11). Ob zusätzliche Bereiche der tRNA bei der Stabilisierung des Aminoacyl-tRNA-Matrizen-Ribosomen-Komplexes eine wesentliche Rolle spielen, ist heute nicht gesichert, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Neben dem Anticodon könnten durchaus weitere Ribosomen-Bindungsregionen auf der tRNA existieren; die Spezifität der Matrizen-RNA-tRNA-Wechselwirkung wird jedoch durch die eigentliche Erkennungsregion auf der tRNA, dem Anticodon, bewirkt.

Der Mechanismus der spezifischen Aminosäure-Erkennung der tRNA ist hingegen noch nicht aufgeklärt. Er stellt ein Problem dar, das heute mehrere Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der tRNA-Forschung intensiv beschäftigt (Übersicht: Ref. 11-15). Dieser Mechanismus ist durch eine sehr hohe Präzision gekennzeichnet. Jede tRNA akzeptiert in der Beladungsreaktion nur die ihr zugehörige Aminosäure; der Einbau einer anderen natürlichen Aminosäure liegt unter der Nachweisgrenze, die mit 1:10000 angegeben wird (16).

Die Beladungsreaktion wird spezifisch von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nach folgendem Schema katalysiert:

$$\text{Aminosäure} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Aminoacyl-AMP} + \text{Pyrophosphat}$$

$$\text{Aminoacyl-AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{Aminoacyl-tRNA} + \text{AMP}.$$

Zu jeder Aminosäure gehört mindestens ein aktivierendes Enzym. Damit ist offenbar das Problem der spezifischen Aminosäure-Erkennung durch die tRNA in Wirklichkeit ein Problem der spezifischen Enzym-Erkennung oder ganz allgemein, ein Problem der spezifischen Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkung. Aus einer großen Anzahl von Experimenten (Übersicht: Ref. 15) muß geschlossen werden, daß für die Spezifität der Wechselwirkung zwischen der tRNA und der Aminoacyl-tRNA-Synthetase - ähnlich wie im Fall der tRNA-Matrizen-RNA-Wechselwirkung - eine

begrenzte Erkennungsregion auf der tRNA verantwortlich ist. Diese Erkennungsregion könnte eine bestimmte Nucleotidsequenz, aber auch ein Raumstrukturelement der tRNA sein. Mit Sicherheit spielt bei der Erkennung der Aminoacyl-tRNA-Synthetase die dreidimensionale Struktur der tRNA eine wichtige Rolle. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß denaturierte tRNA (17,18) keine Akzeptoraktivität besitzt. Die strukturellen Grundlagen der spezifischen Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkung sind noch gänzlich ungelöst. Sie zu lösen, ist u.a. eines der Fernziele der Nucleinsäureforschung, denn wichtige Regulationsprozesse im Zellgeschehen beruhen auf spezifische Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkungen (Operator-Repressor), wie auch möglicherweise die Gesetze der Zelldifferenzierung.

Zum Studium der Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkung bieten sich die tRNAs als ideale Modell-Moleküle an, da durch die intensive Forschung auf diesem Gebiet Methoden der Anreicherung und Analyse molekulareinheitlicher Nucleinsäuren erarbeitet worden sind. Ferner ist es vorteilhaft, mit tRNAs zu arbeiten, da diese außer mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase auch mit einer Reihe von modifizierenden Enzymen im Verlauf ihrer Biosynthese in spezifische Wechselwirkungen treten. Zu diesen Enzymen gehören jene, die einige Nucleoside in bestimmten homologen Positionen der tRNA-Ketten zu sogenannten seltenen Nucleosiden umwandeln. Zu ihnen kann auch die CCA-Pyrophosphorylase gezählt werden, die die Anheftung des CCA-Endes aller tRNAs einer Spezies katalysiert. Für diese Enzyme sollten alle tRNAs identische Erkennungsregionen besitzen.

Eine Möglichkeit zur Lokalisierung von Enzym-Erkennungsregionen auf der tRNA bietet die chemische Modifizierung. Mit Hilfe der chemischen Modifizierung konnten gewisse Erkenntnisse, hinsichtlich der Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Erkennung, gesammelt werden. Die Behandlung von $tRNA^{Phe}$ aus E. coli mit Formaldehyd zeigte, daß die $tRNA^{Phe}$ 4 - 8 sensitive Stellen für die Synthetase hat (19). 8 Treffer braucht die $tRNA^{Ala}$ aus Hefe zur vollständigen Inaktivierung der Akzeptoraktivität durch die Photoreduktion der U-Reste (20). Bei der Behandlung von unfraktionierter $tRNA_{coli}$

mit salpetriger Säure geht die Akzeptoraktivität für Phe schneller verloren als für Leu, Lys oder Val (21). In $tRNA_{Hefe}$ dagegen wird die Akzeptoraktivität für Phe, Lys und Val etwa gleich schnell inaktiviert (22). Ein unterschiedliches Verhalten der Akzeptoraktivitäten für $tRNA^{Phe}$, verglichen mit anderen tRNAs, konnte bei der Bromierung festgestellt werden (23). Bei der Cytidin-spezifischen Modifizierung mit Semicarbazid geht die Akzeptoraktivität von $tRNA^{Val}$ aus Torula-Hefe dreimal so schnell verloren wie die Akzeptoraktivität von $tRNA^{Tyr}$ (24). Unterschiedlich verhält sich auch die Akzeptoraktivität verschiedener tRNAs aus E. coli bei der Modifizierung mit Bromcyan (25).

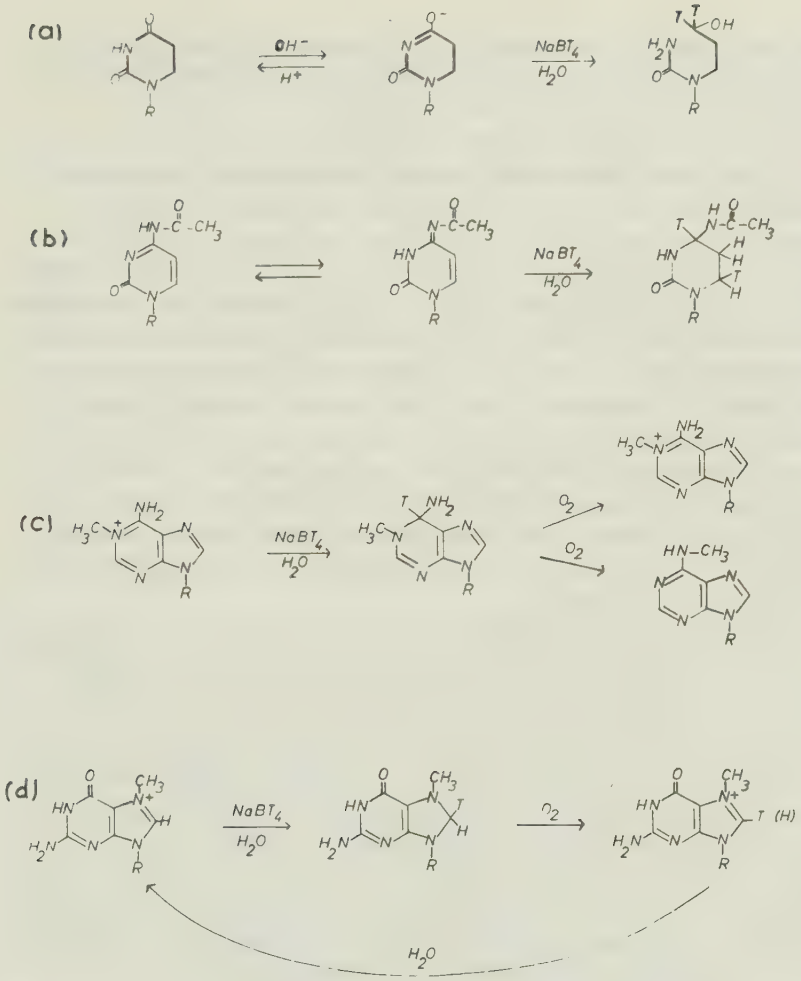
In einigen Fällen konnten aus Daten der chemischen Modifizierung molekulareinheitlicher tRNAs einzelne Strukturbereiche zu Funktionen der tRNA in Beziehung gebracht werden (26-30). Die genauen Angriffsstellen der modifizierenden Agentien konnten durch Oligonucleotidanalysen nach Spaltung der modifizierten tRNAs mit spezifischen Nucleasen ermittelt werden. Schulmann und Chambers benutzten UV-Licht zur Modifizierung von $tRNA^{Ala}$ (31). Nach weitgehender Inaktivierung der Alanin-Akzeptoraktivität trennten sie die verbliebenen aktiven Moleküle von den inaktiven ab. Die Oligonucleotidanalysen ergaben, daß auch die aktiven Moleküle ein heterogenes Gemisch darstellten, wobei Modifizierungen in nahezu allen Bereichen der $tRNA^{Ala}$ nachgewiesen wurden. Keine Veränderung wurde jedoch in den ersten drei Basenpaaren des "Akzeptorstammes" festgestellt. Offensichtlich führt eine Modifizierung in dieser Region der $tRNA^{Ala}$ unweigerlich zum Verlust der Akzeptoraktivität. Aus diesen Ergebnissen leiteten Schulmann und Chambers die allgemeine Hypothese ab, daß die ersten drei Basenpaare des "Akzeptorstammes" der einzelnen tRNAs die spezifische Erkennungsregion für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase sind. Diese Hypothese konnte jedoch noch nicht gesichert werden.

Die Modifizierung von minoren Komponenten der tRNA brachten einige interessante Informationen über Zusammenhänge zwischen der Struktur und der Funktion der tRNA. Die spezifische Jodierung von i^6A, eines minoren Nucleosids neben dem Anticodon zahlreicher tRNAs (11), bewirkte bei $tRNA^{Ser}$, daß die Ribosomen-Bindungsaktivität vermindert wurde, die Akzeptoraktivität jedoch voll erhalten blieb (32,33). Thiebe und Zachau (34) fanden, daß die Bindungskapazität von $tRNA^{Phe}$ nach Herausspalten von Y

aus der "Anticodon-Schleife" verloren geht, die Akzeptoraktivität jedoch voll erhalten bleibt. Selbst nach Einführung eines Kettenbruchs durch Behandlung der $tRNA^{Phe}$(HCl) mit Anilin, hatte das Gemisch der entstandenen $tRNA^{Phe}$-Hälften gute Akzeptoraktivität (35). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Modifizierung von I und in der "Anticodon-Region" von $tRNA^{Ala}$ mit Acrylnitril erhalten (27).

Über spezifische Modifizierungen von seltenen Nucleosiden, die nicht in der "Anticodon-Region" der tRNAs lokalisiert sind, war wenig bekannt. Als besonders interessant erschien eine selektive Modifizierung von Dihydrouridin. hU kommt in tRNA von Bakterien (36), Hefe (37), Pflanzen (38) und Säugern (39) in bestimmten Regionen, der "hU-Schleife" und weniger häufig in der "S-Region" vor (11). Bemerkenswert ist, daß diese beiden Bereiche von verschiedenen tRNAs einer Spezies relativ große Unterschiede untereinander aufweisen. Die Unterschiede wären groß genug dafür, daß diese Bereiche als die spezifischen Erkennungsregionen für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen fungieren könnten (13, 40). Die "hU-Schleife" und die "S-Region" von mehrenen tRNAs, die von derselben Aminoacyl-tRNA-Synthetase beladen werden, sind in vielen Fällen sehr ähnlich (39, 41-43), wie es die Hypothese erfordern würde, wenn diese beiden Regionen die Enzymerkennungsstelle wären.

Als Cerutti und Miller (44) von der reduktiven Öffnung des Dihydrouracil-Ringes mit $NaBH_4$ berichteten, schien diese Reaktion zur Modifizierung von hU-enthaltenden tRNAs geeignet. Bald zeigte sich, daß diese Reaktion nicht absolut spezifisch für hU ist, denn weitere seltene Nucleoside, wie ac^4C (45), m^3C und m^1A (46), m^7G (2.6.3 sowie Ref. 47,48) und Y (30) können mit $NaBH_4$ reduziert werden. Schema 1 zeigt den Verlauf der Reaktionen mit $NaBH_4$ für die Nucleoside, die in dieser Arbeit vorkommen. Es ist eine interessante Frage, welche Rolle diese seltenen Nucleoside in der tRNA haben. Über ihre Rolle ist sehr wenig bekannt. Sie könnte in der Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur als auch in einer Funktion bei der spezifischen Wechselwirkung mit Enzymen (Aminoacyl-tRNA-Synthetase, CCA-Pyrophos-



Schema 1: Reduktion von Dihydrouridin (a), 4-Acetylcytidin (b), 1-Methyladenosin (c) und 7-Methylguanosin mit Natriumborhydrid.

phorylase usw.) liegen. Durch eine spezifische Modifizierung mit $NaBH_4$ sollte es möglich sein, Informationen über die Rolle dieser Nucleoside in der tRNA zu erhalten.

Eine wichtige Voraussetzung für die Brauchbarkeit chemischer Reagentien zur Modifizierung von tRNA ist ihre Selektivität. Cerutti und Miller (44) konnten nicht vollständig ausschließen, daß G in geringem Umfang von $NaBH_4$ angegriffen wird. Eine langsame U-Modifizierung unter gewissen Reduktionsbedingungen konnte nachgewiesen werden (49). Deswegen mußte vor allem die Selektivität der Reaktion ermittelt werden. Ferner mußte die quantitative Seite der Reduktion untersucht werden. Es wurde nämlich vermutet, daß nicht alle seltenen Nucleoside mit derselben Geschwindigkeit in der tRNA reagieren wie im freien Zustand. Es ist bekannt, daß Nucleoside in strukturierten Bereichen der tRNA gegen chemische Modifizierungen geschützt sind (26-28, 50, 51). Im einzelnen sollten folgende Fragen in der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

1. Ist die quantitative Umwandlung aller reduzierbaren Nucleoside auch in der tRNA-Kette unter milden Bedingungen möglich? Wenn nicht,
   a) welche Nucleoside sind in geschützten, welche in exponierten Stellen des Makromoleküls lokalisiert?
   b) Welche Region der tRNA übt den Schutz gegen das Reduktionsmittel auf das Nucleosid aus?
2. Verläuft die Reduktion selektiv? D.h. erfolgt nicht eine unerwünschte, partielle Reduktion der hauptsächlichen Nucleoside, oder entstehen nicht Kettenbrüche unter den Reduktionsbedingungen?
3. Welchen Einfluß hat die Reduktion der seltenen Nucleoside auf die biologischen Aktivitäten der tRNA?
   a) Auf die spezifische Erkennung der Aminoacyl-tRNA-Synthetase,
   b) auf die Erkennung der CCA-Pyrophosphorylase,
   c) auf die Ausbildung eines stabilen tRNA-mRNA-Ribosomen-Komplexes,
   d) und auf die Transferaktivität der tRNA?

2. Analyse der Transfer-Ribonucleinsäuren nach der Behandlung mit Natriumborhydrid

2.1 Reduktionsgeschwindigkeit seltener Nucleoside in unfraktionierter und Serin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure

Bei Verwendung von $NaBT_4$ kann die Reduktionsgeschwindigkeit der seltenen Nucleoside in der tRNA leicht verfolgt werden. Sie ist der in der Zeiteinheit eingebauten äthanol- oder der säurefällbaren Radioaktivität direkt proportional. Zur Reduktion der tRNA wurden die Bedingungen der hU-Reduktion (44) übernommen. Lediglich $MgCl_2$ wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich zugegeben, da Mg^{2+}-Ionen stabilisierend auf die Raumstruktur der tRNA wirken. Die 2. Abbildung zeigt den Einbau von äthanolfällbarer Radioaktivität in unfraktionierte tRNA bzw. angereicherte $tRNA^{Ser}$ in Abhängigkeit von der Reduktionszeit.

Nach einer schnellen Reaktion, die nach etwa 2 Stunden beendet ist, folgt ein weiterer langsamer Anstieg des Einbaus von Tritium in die tRNA. Ob dieser langsame Anstieg auf eine Nebenreaktion deutet, kann aus dem Experiment nicht entnommen werden. Wahrscheinlich handelt es sich um einen reversiblen Einbau von Radioaktivität, möglicherweise über einen langsamen Austausch von Protonen (T^+), die aus Verunreinigungen des $NaBT_4$ stammen. Zu diesem Schluß gelangt man bei Berücksichtigung der Oligonucleotidanalysen (2.4, 2.5, 2.6.1). Nach intensiver Reinigung der tRNAs nach dreistündiger Behandlung mit $NaBT_4$ sind keine nennenswerten radioaktiven Nebenprodukte in den Elutionsdiagrammen (Abbildungen 4, 6 und 8) zu beobachen. Weniger gut gereinigte tRNAs liefern bei der Oligonucleotidanalyse einen zusätzlichen radioaktiven Gipfel, der mit der Pufferfront von der Säule eluiert wird und beim Einengen der Lösung flüchtig ist. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Tritium-Wasser.

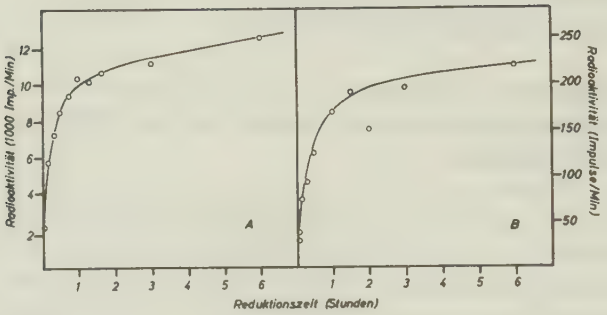


Abbildung 2: Geschwindigkeit der Reduktion seltener Nucleoside in der tRNA. 1.66 A_{260}-Einheiten enthaltende Anteile von unfraktionierter tRNA (A) bzw. 0.2 A_{260}-Einheiten enthaltende Anteile von angereicherter $tRNA^{Ser}$ (B) wurden mit $NaBT_4$ reduziert. Nach den angedeuteten Reaktionszeiten wurden die Anteile mit 1 M Essigsäure angesäuert und mit Äthanol gefällt. Zur Reinigung der tRNA von radioaktiven Beimengungen wurden die Fraktionen weitere dreimal aus einer 2%igen Kaliumacetat-Lösung mit Äthanol umgefällt. Zum Zählen der Radioaktivität wurde die tRNA schließlich mit einer eiskalten 5% TCA-Lösung gefällt, über Membranfilter abfiltriert und die getrockneten Filter in 5 ml Toluol-Szintillator gezählt. Die Zählausbeute betrug unter diesen Bedingungen 280 Imp/Min pro nC.

2.2 Quantitative Auswertung der Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid

Die quantitative Auswertung der Reaktion an Hand der in die tRNA eingebauten Radioaktivität erwies sich als problematisch. Hierfür können hauptsächlich zwei Gründe angeführt werden:

1. Die Unsicherheit, die mit der angegebenen spezifischen Radioaktivität des $NaBT_4$ verbunden ist. Technisch wird $NaBT_4$ aus $NaBH_4$ durch Tritiumaustausch gewonnen. Bei dieser Prozedur entstehen radioaktive Verunreinigungen, die die wirkliche spezifische Radioaktivität verfälschen. Ferner garantiert der Hersteller die homogene Verteilung der Radioaktivität im pulverförmigen Präparat nicht.
2. Die Unsicherheit der spezifischen Radioaktivität in der Lösung. Diese ist im vorliegenden Fall deshalb besonders schwierig zu bestimmen, weil sich das Natriumborhydrid unter den Reduktionsbedingungen langsam zersetzt. Diese Zersetzung verläuft für $NaBH_4$ mit einer anderen Geschwindigkeit als für $NaBT_4$, so daß sich die spezifische Radioaktivität des Reduktionsmittels während des Verlaufs der Reduktion ständig verändert.

Die 1. Tabelle zeigt die Ergebnisse der quantitativen Auswertung von Versuchen mit angereicherten tRNAs, Östron und Dihydrouridin. Die beiden letztgenannten Substanzen sollten als Bezugssubstanzen dienen. Aus der Tabelle geht klar hervor, daß man zu niedrige Werte erhält, wenn man die vom Hersteller angegebenen spezifischen Radioaktivitäten des $NaBT_4$ in die Berechnungen einsetzt. Korrigiert man jedoch die Werte, indem man sie auf die Standard-Reagentien bezieht, bei denen die quantitative Reduktion gesichert ist (Östron, hU), so kommt man in die richtige Größenordnung. Exakte Werte konnten jedoch auch durch die Korrektur nicht erhalten werden.

	A_{260}-Einheiten eingesetzt	nMol eingesetzt	Spez.Radioakt. des $NaBT_4$ (C/M)	Eingebaute Radioakt. (Imp/Min)	Zählausbeute (Imp/Min pro nC)	Tritium-Einbau (Mol/Mol) gefund.	korr.	erwarte
$tRNA^{Ser}$	4.7	6.58	7.54	10 150	580	0.35	4.4	7
$tRNA^{Phe}$	7.34	11.74	200	301 727	580	0.22	2.75	?
$tRNA^{Phe}$ (HCl)	8.6	13.76	200	326 744	580	0.20	2.5	7
Östron	-	41.6	4.0	6 200	410	0.091	1.1	1
Dihydro-uridin	-	39.4	7.54	27 500	580	0.16	(2)	2

Tabelle 1: Reduktion von Transfer-Ribonucleinsäuren und Referenzsubstanzen (Östron, Dihydrouridin) mit radioaktivem Natriumborhydrid. Die spezifischen Radioaktivitäten wurden aus der Verdünnung von $NaBT_4$ (200 C/M) mit nicht markiertem $NaBH_4$ errechnet. Die gefundenen Tritium-Einbauwerte ("gefunden") wurden auf Dihydrouridin als Standard bezogen ("korrigiert"). In $tRNA^{Ser}$ wurde der Einbau von 6 Mol Tritium in 3 hU-Reste sowie 1 Mol Tritium in 0.5 ac^4C (laut Analyse, vergl. Ref. 55) erwartet. $tRNA^{Phe}$ enthält ein unbekanntes Nucleosid (Y); es war nicht bekannt, ob Y mit $NaBT_4$ reagiert. Der Einbau von 7 Mol Tritium in $tRNA^{Phe}$ (HCl) wurde erwartet: 2 hU (4), 1 Ribose (1), 1 m^1A (1) und 1 m^7G (1).

2.3 Photometrische Dihydrouridin-Bestimmung in tRNA

Die Frage, wie weit die hU-Moleküle in der tRNA mit $NaBH_4$ unter den Standardbedingungen reduziert werden, konnte unabhängig vom Tritiumeinbau in die tRNA geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Methode abgewandelt, die von Batt und Mitarbeitern (52) zur Bestimmung von hU angegeben wurde. Diese photometrische Methode beruht auf der Tatsache, daß hU in stark alkalischer Lösung ein Absorptionsmaximum mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 9.2×10^3 (53) bei 235 nm besitzt. Die Absorption bei 235 nm verschwindet in 0.1 M NaOH wieder rasch, bedingt durch die hydrolytische Ringöffnung des hU bei diesem pH (54). Die Differenz der Ablesung, gleich nach der Zugabe von Alkali und nach Beendigung der Ringöffnungsreaktion, ist ein quantitatives Maß für den hU-Gehalt der tRNA. Die 3. Abbildung zeigt die Änderung der Absorption bei 235 nm von reduzierter $tRNA^{Tyr}$, $tRNA^{Phe}$ und von den nicht reduzierten Kontrollen nach Alkalizugabe. Es ist ersichtlich, daß beide tRNAs nach dreistündiger Reduktion kein unreduziertes hU mehr enthalten.

Ob andere seltene Nucleoside in den tRNAs reduziert wurden, wie weitgehend eventuelle Veränderungen verliefen, und ob Nebenreaktionen, wie z.B. Kettenbrüche, bei der Reduktion aufgetreten sind, sollte durch die Oligonucleotidanalyse von $NaBT_4$ reduzierter $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Tyr}$ und $tRNA^{Phe}$ nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase ermittelt werden.

2.4 Oligonucleotidanalyse von Serin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid und Spaltung mit T1-Ribonuclease und alkalischer Phosphatase

Die 4. Abbildung zeigt das Elutionsdiagramm der Oligonucleotide von $tRNA^{Ser}$ nach Behandlung mit $NaBT_4$ und vollständiger Spaltung mit T1-RNase sowie mit alkalischer Phosphatase. Radioaktivität wurde in bedeutenden Mengen nur in den Oligonucleotiden hU^+-Gm-G

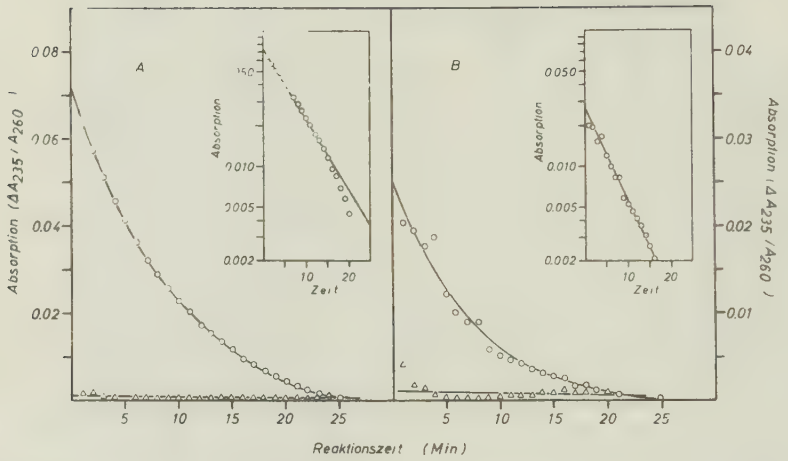


Abbildung 3: Photometrische Dihydrouridin-Bestimmung in reduzierten (Δ——Δ) bzw. nicht reduzierten (o——o) Transfer-Ribonucleinsäuren. Gemessen wurde die Abnahme der Absorption von 1.795 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Tyr}$ (A) und von 1.899 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$ (B) in 1 ml 0.1 M NaOH bei 235 nm. Die Absorption zu Beginn der Reaktion läßt sich graphisch aus dem Ordinatenabschnitt ermitteln, wenn die Meßwerte halblogarithmisch aufgetragen werden (innere Bilder). 1.8 Mol hU in unreduzierter $tRNA^{Phe}$ und 5.1 Mol hU in unreduzierter $tRNA^{Tyr}$ konnten bestimmt werden (1 A_{260}-Einheit $tRNA^{Phe}$ bzw. $tRNA^{Tyr}$, bei pH 7.0 gemessen, entsprechen 1.6 nMol). Weder in $tRNA^{Tyr}$ noch in $tRNA^{Phe}$ war nach dreistündiger Behandlung mit $NaBH_4$ Dihydrouridin nachweisbar. 10% in reduzierter $tRNA^{Phe}$ bzw. 3.5% in reduzierter $tRNA^{Tyr}$ wären nachweisbar gewesen.

und hU^+-hU^+-A-A-G gefunden. Das Verhältnis der Gesamtradioaktivitäten in den beiden Oligonucleotiden betrug 1:1.85 (in einem anderen Experiment 1:1.95) in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert von 1:2. Die Spezifität der Reduktion für hU in der $tRNA^{Ser}$ ist aus der Abbildung offensichtlich.

Nach Abbau von hU^+-Gm-G mit Schlangengift-PDE und PME konnten die drei erwarteten Produkte hU^+, Gm und G erhalten und papierchromatographisch in System A aufgetrennt werden (R_A-Werte: 0.2, 0.9 und 0.4). Die gesamte Radioaktivität wurde in hU^+ wiedergefunden. Der Abbau des Trinucleotids mit Pankreas-RNase lieferte nach der Trennung auf einer DEAE-Cellulose-Säule zwei Produkte: hU^+p und Gm-G. Kein unreduziertes hU konnte entdeckt werden, wenn die Fraktionen von der Säule mit Alkali behandelt wurden und die Absorption bei 235 nm gemessen wurde (siehe 2.3).

Nach Abbau von hU^+-hU^+-A-A-G mit Schlangengift-PDE wurden papierelektrophoretisch neben pA und pG drei radioaktive Produkte gefunden: hU^+, phU^+ und hU^+-hU^+ (R_{Up}-Werte: 0.1, 1.0 und 0.7). Offenbar verläuft die Spaltung der hU^+-hU^+-Bindung durch PDE unvollständig unter Bedingungen, die vollkommen ausreichen, um andere Oligonucleotide quantitativ zu spalten.

In dem Trinucleotid C-ac^4C-G wurde keine Radioaktivität gefunden. Dies bedeutet, daß ac^4C als Glied der tRNA-Kette gegen die Reduktion geschützt ist. Dieser Schutz ist auch gegen die alkalische Hydrolyse wirksam, da das Trinucleotid C-ac^4C-G nach der Behandlung der $tRNA^{Ser}$ mit $NaBH_4$ (bei pH 9.8) in ähnlichen Mengen isoliert werden konnte wie in früheren Analysen (55) ohne Behandlung mit $NaBH_4$ oder Alkali. Bei pH 11 hydrolysiert freies ac^4C mit einer Halbwertszeit von 40 Minuten zu C und Acetat (56).

Es war interessant festzustellen, wodurch dieser Schutz für ac^4C bedingt ist. Es konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß dieser Schutz durch eine sterische oder elektrostatische Abschirmung durch die Phosphodiester-Bindung bewirkt wird. Das Experiment zeigt klar, daß die Phosphodiester-Bindung allein

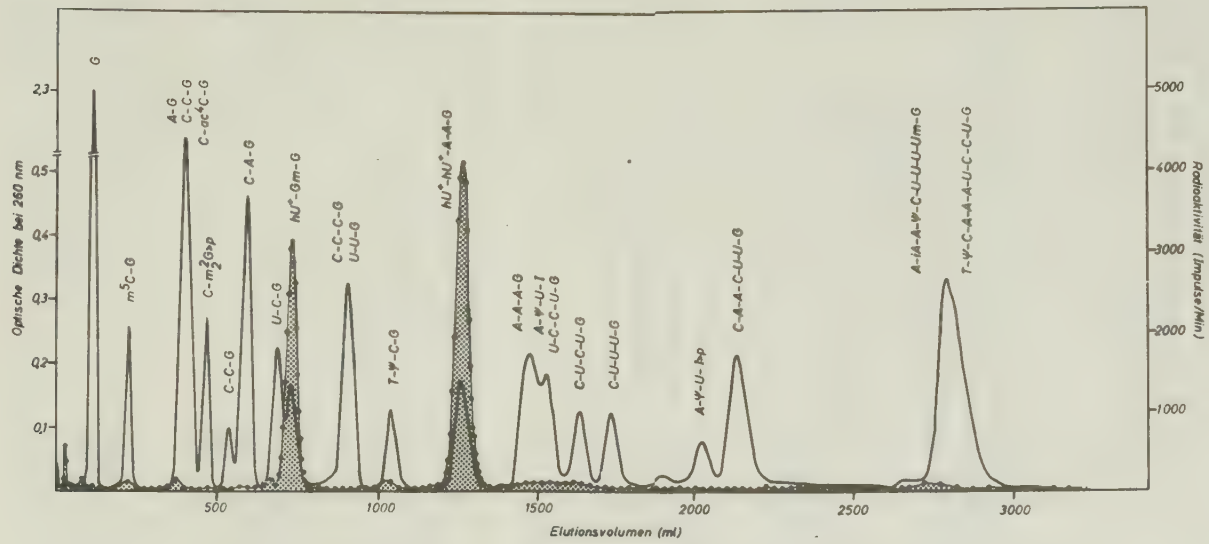


Abbildung 4: Chromatographie der Oligonucleotide von $tRNA^{Ser\ I+II}_{Hefe}$ nach Behandlung mit $NaBT_4$ und vollständiger Spaltung mit T1-RNase und PME. 200 A_{260}-Einheiten der reduzierten tRNA wurden gegen 0.01 M Kaliumacetat, pH 5.5, über Nacht und anschließend 2 Stunden gegen Wasser dialysiert. Die Spaltung mit T1-RNase/PME wurde nach einer bekannten Vorschrift (55) durchgeführt. Die Oligonucleotide wurden bei 4° mit 3 linearen Ammoniumcarbonat-Gradienten (1.: 900 ml von 2 x 500 ml 0.02 und 0.12 M; 2.: 1570 ml von 2 x 1000 ml 0.10 und 0.32 M; 3.: 2 x 800 ml 0.25 und 0.6 M) bei pH 8.6 von einer 1 x 50 cm DEAE-Cellulose-Säule eluiert. 5 ml Fraktionen wurden gesammelt. ———, Absorption bei 260 nm; o——o, Radioaktivität von 0.5 ml Anteilen in 10 ml Bray-Szintillator (punktierte Flächen).

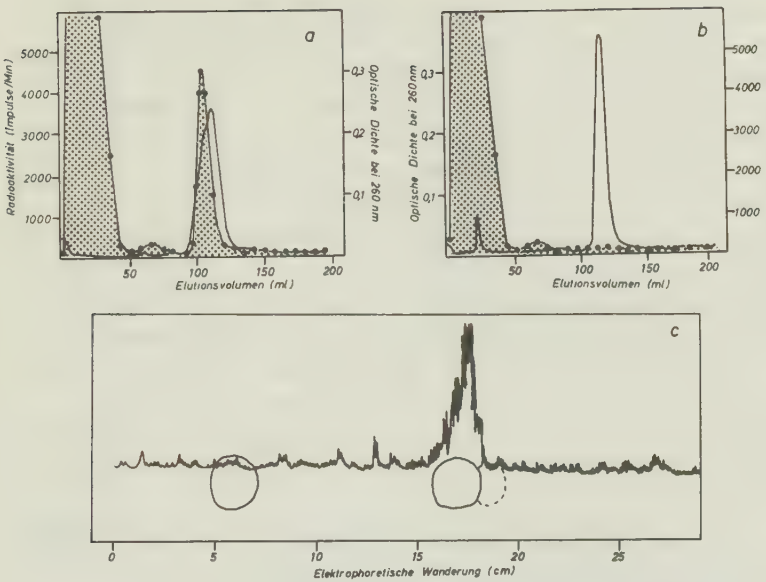


Abbildung 5: Säulenchromatographie von C-ac^{4}C-G (A) und C-C-G (B) nach Behandlung mit $NaBT_4$. Die Lösungen wurden nach zweistündiger Reduktion mit 1 M Essigsäure angesäuert, mit Wasser auf das fünffache Volumen verdünnt und auf 0.3 x 10 cm DEAE-Cellulose-Säulen aufgetragen. Die Trinucleotide wurden bei 4° mit einem linearen Ammoncarbonat-Gradienten (2 x 150 ml 0.01 M und 0.16 M, pH 8.6) eluiert. ———, Optische Dichte bei 260 nm; ●——●, Radioaktivität von 0.2 ml Anteilen. Die Oligonucleotid-Fraktion der Abbildung 5 A wurde durch Papierelektrophorese bei pH 3.5 aufgetrennt (C). Die gesamte Radioaktivität im Elektropherogramm wanderte mit C-ac^{4}C$^+$-G (R_{Up} 0.47). Im C-C-G (R_{Up} 0.17), das durch Hydrolyse von C-ac^{4}C-G während der $NaBT_4$-Behandlung entstanden ist, war keine Radioaktivität feststellbar.

nicht ausreicht, um ac^4C gegen die Reduktion oder gegen die alkalische Hydrolyse zu schützen (Abb. 5). Im Trinucleotid C-ac^4C-G wird ac^4C teils zu Tetrahydro-ac^4C (ac^4C^+) und teils zu C umgewandelt. Diese Umwandlung geschah unter Bedingungen, unter denen ac^4C als Teil der intakten tRNA-Struktur vollkommen resistent ist. Eine Kontrolle zeigt, daß die Radioaktivität im C-ac^4C^+-G keine mitgeschleppte Verunreinigung ist, da bei der Chromatographie von C-C-G nach Behandlung mit $NaBT_4$ keine Radioaktivität in der entsprechenden Position des Säulendiagramms auftritt (Abb. 5 B). Die Abbildung 5 C zeigt, daß die gesamte Radioaktivität bei der Papierelektrophorese mit C-ac^4C^+-G wandert (R_{Up} 0.47) und nicht mit C-C-G (R_{Up} 0.17), das durch Hydrolyse bei der Reduktion entstanden ist. Das UV-Spektrum des C-ac^4C^+-G ist (übereinstimmend mit der Erwartung) identisch mit einem C-G-Spektrum.

2.5 Oligonucleotidanalyse von Tyrosin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid und Spaltung mit T1-Ribonuclease

Die $tRNA^{Tyr}$ unterscheidet sich von den anderen bisher bekannten tRNAs durch das besonders häufige Vorkommen von hU in der Kette (11). Fünf hU-Reste kommen in der "hU-Region" und ein hU in der "S-Region" der $tRNA^{Tyr}$ vor. Das besondere Interesse bei der Analyse der reduzierten $tRNA^{Tyr}$ galt der Frage, ob auch das hU in der "S-Region" unter milden Bedingungen mit Natriumborhydrid reduzierbar ist. Die photometrische Analyse von reduzierter $tRNA^{Tyr}$ (2.3) ergab, daß alle hU-Moleküle reduzierbar sind. Es erschien jedoch angebracht, diesen Befund durch eine weitere analytische Methode zu sichern.

Die 6. Abbildung zeigt das Elutionsdiagramm von $tRNA^{Tyr}$ nach Reduktion mit $NaBT_4$ und vollständiger Spaltung mit T1-RNase. Die Selektivität des Reduktionsmittels für hU ist wiederum deutlich. Radioaktivität wurde ausschließlich in den hU enthaltenden Oligonucleotiden gefunden. Das hU in der "S-Region" der $tRNA^{Tyr}$ wurde voll reduziert in Übereinstimmung mit der

photometrischen Analyse (2.3).

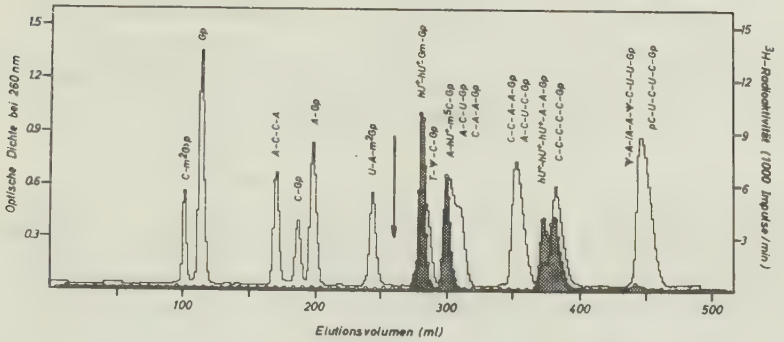


Abbildung 6: Chromatographie der Oligonucleotide von $tRNA^{Tyr}$ nach $NaBT_4$-Behandlung und vollständiger Spaltung mit T1-RNase. 60 A_{260}-Einheiten der reduzierten tRNA wurden durch Umfällen mit Äthanol und Dialyse (siehe 4.3.4 und Abb. 4) von radioaktiven Verunreinigungen befreit. Die Spaltung der tRNA wurde in 2 ml mit 500 Einheiten T1-RNase bei 45°, pH 7.5, durchgeführt. Die Oligonucleotide wurden an einer DEAE-Cellulose-Säule (0.3 x 100 cm) mit einem linearen NaCl-Gradienten (2 x 350 ml 0.01 und 0.3 M, in 0.005 M Tris-HCl, pH 7.5, 7 M Harnstoff) bei 24° chromatographiert. 1.36 ml Fraktionen wurden aufgefangen. ———, Optische Dichte bei 260 nm; o——o, Radioaktivität von 0.2 ml Anteilen in 10 ml Bray-Szintillator (punktierte Flächen).

Das Elutionsdiagramm in der 6. Abbildung zeigt im Vergleich zu dem Elutionsmuster von Madison et al. (57) zwei auffällige Unterschiede. Das bei Madison auftretende Pentanucleotid m^1A-C-U-C-Gp fehlt in der 6. Abbildung vollkommen (die Stelle ist mit einem Pfeil markiert). Dafür tritt ein neues Oligonucleotid in Erscheinung, das später von der Säule eluiert wird. Der zweite Unterschied ist, daß das Hexanucleotid, das bei Madison dem hU-hU-hU-A-A-Gp entspricht, zwei Gipfel der optischen Dichte sowie der Radioaktivität im Elutionsdiagramm zeigt. Die zwei

Oligonucleotide haben auch verschiedene elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten (R_{Up} 0.86 bzw. 0.61). Weitergehende Analysen dieser beiden Oligonucleotide wurden noch nicht durchgeführt. Diese Heterogenität ist jedoch mit Sicherheit kein Kunstprodukt der Natriumborhydrid-Reduktion, da auch unbehandelte $tRNA^{Tyr}$ ein identisches Elutionsdiagramm liefert.

Das neue Pentanucleotid, das anstelle von m^1A-C-U-C-Gp im Elutionsdiagramm auftritt, wurde isoliert und von dem begleitenden Pentanucleotid C-C-A-A-Gp elektrophoretisch abgetrennt. Nach vollständiger Spaltung mit Schlangengift-PDE und PME wurden die Nucleoside auf einer Dünnschichtplatte im System B aufgetrennt (Abb. 7). A, U, C und G wurden gefunden, jedoch kein m^1A oder m^6A. Dieser Befund zeigt, daß die benutzte $tRNA^{Tyr}$ untermethyliert ist und A-C-U-C-Gp anstelle von m^1A-C-U-C-G enthält. Ob die Heterogenität des radioaktiven Hexanucleotids ebenfalls auf eine nicht vollständige Modifizierung durch das hU-synthetisierende Enzym zurückzuführen ist, kann vorerst noch nicht entschieden werden. Eine Klärung dieser Frage wäre jedoch interessant, da noch nicht bekannt ist, ob hU durch die enzymatische Reduktion von U oder C entsteht. Bemerkenswert ist auch die niedrige Bindungsaktivität dieser $tRNA^{Tyr}$-Fraktion an den Matrizen-Ribosom-Komplex (3.2).

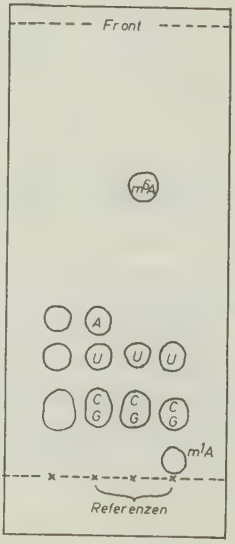


Abbildung 7: Nucleosid-Analyse des neu im Elutionsmuster von $tRNA^{Tyr}$ auftretenden Pentanucleotids (siehe Text). Das elektrophoretisch gereinigte Pentanucleotid wurde mit Schlangengift-PDE und PME vollständig gespalten. Die Auftrennung der Nucleoside erfolgte mittels Dünnschicht-Chromatographie in System B. Auf die weiteren Auftragsstellen wurden Referenzsubstanzen aufgetragen.

2.6 Reduktion von Phenylalanin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure und von Fragmenten mit Natriumborhydrid

2.6.1 Oligonucleotidanalyse von Phenylalanin-spezifischer Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid und Spaltung mit T1-Ribonuclease

Das Elutionsdiagramm von reduzierter $tRNA^{Phe}$ nach Spaltung mit T1-RNase (58) ist in der 8. Abbildung dargestellt. Nur im Trinucleotid hU^{+}-hU^{+}-Gp und im Dodekanucleotid A-Cm-U-Gm-A-A-Y^{+}-A--m^{5}C-U-Gp wurde Radioaktivität in nennenswerten Mengen gefunden. Die Radioaktivität des Dodekanucleotids konnte unter milden Bedingungen mit Säure herausgespalten werden (34). Dies bedeutet, daß im Dodekanucleotid das Nucleosid Y reduziert wurde. Nach den Analysen von Herrn Dr. Thiebe in unserem Laboratorium verlief die Reduktion zu etwa 70% unter den angewandten Reduktionsbedingungen. Der Einbau von 4 Mol Tritium pro Mol Y konnte ermittelt werden.

Die m^{1}A bzw. m^{7}G enthaltenden Oligonucleotide enthielten keine Radioaktivität. Da die Reduktionsprodukte beider Nucleoside durch Luftsauerstoff leicht oxidierbar sind (46-48), bedeutet dieser Befund nicht eindeutig, daß beide Nucleoside in geschützten Positionen der $tRNA^{Phe}$ lokalisiert sind. Sie können auch bei der Reinigung der reduzierten $tRNA^{Phe}$ wieder oxidiert worden sein und auf diese Weise die Radioaktivität verloren haben. Beide Nucleoside kommen in analogen Positionen vieler bekannter tRNA-Sequenzen vor (11), beide enthalten eine positive Ladung unter physiologischen Bedingungen und könnten möglicherweise eine bestimmte Rolle in der Struktur und Funktion der tRNA haben. Es erschien deswegen interessant festzustellen, ob diese Nucleoside in exponierten oder geschützten Positionen der $tRNA^{Phe}$ lokalisiert sind. Es hat sich bald gezeigt, daß die Stabilität der reduzierten Nucleoside $m^{1}A^{+}$ und $m^{7}G^{+}$ gegenüber der Luftoxidation sehr unterschiedlich ist. Deswegen wurde die Reduzierbarkeit von m^{1}A bzw. m^{7}G mit verschiedenen Techniken untersucht und wird getrennt beschrieben.

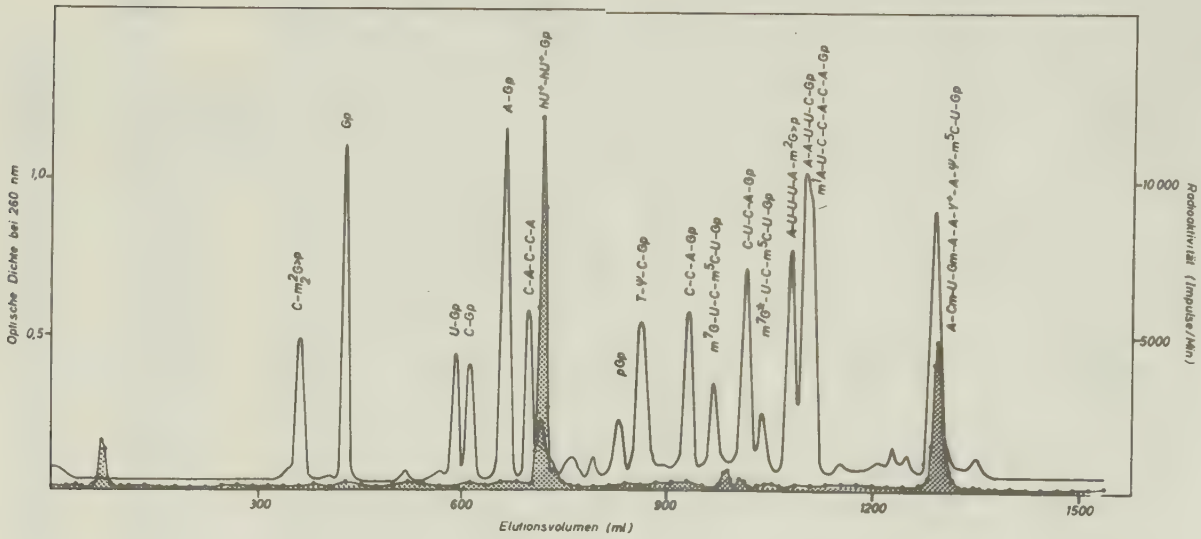


Abbildung 8: Chromatographie der Oligonucleotide von $tRNA^{Phe}$ nach Behandlung mit $NaBT_4$ und vollständiger Spaltung mit T1-RNase. Die Reinigung der tRNA nach der Reduktion erfolgte wie bei $tRNA^{Tyr}$ (Abb. 6). Zur Spaltung wurden 200 A_{260}-Einheiten tRNA in 2 ml 3 Stunden bei 45° und pH 7.5 mit 2000 Einheiten T1-RNase inkubiert. ———, Optische Dichte bei 260 nm; ●——●, Radioaktivität von 0.5 ml Anteilen der einzelnen Fraktionen in 10 ml Bray-Szintillator (punktierte Fläche).

2.6.2 Geschützte Nucleoside in der Phenylalanin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure. Untersuchungen über die Reduzierbarkeit von 1-Methyladenosin in der intakten Transfer-Ribonucleinsäure sowie in Fragmenten.

Die Reduktion von m^1A mit $NaBH_4$ wurde von Macon und Wolfenden beschrieben (46). Das Reduktionsprodukt 1-Methyl-6-hydroadenosin (m^1A^+) ist sauerstoffempfindlich. In Gegenwart von Luftsauerstoff wird m^1A^+ in alkalischer Lösung zu m^6A oder, abhängig vom pH, in ein Gemisch von m^1A und m^6A umgewandelt. In schwach saurer Lösung ist das Reduktionsprodukt dagegen relativ stabil. Erste eigene Versuche ergaben, daß m^1A ohne eine Stickstoff-Schutzatmosphäre bei pH 5.5 chromatographierbar war. Spektrophotometrisch konnten keine Reoxidationsprodukte nachgewiesen werden. Vollständige Oxidation trat jedoch ein, als eine dialysierte und ungepufferte Lösung des reduzierten Oktanucleotids m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp zur Trockne einrotiert wurde. Deswegen wurden in späteren Experimenten die Chromatographiesäulen bei pH 5.5 betrieben und die Lösungen, wo es erforderlich war, unter einer Stickstoff-Schutzatmosphäre durch Gefriertrocknen eingeengt. Diese Maßnahmen waren ausreichend, um reduziertes m^1A für die Oligonucleotidanalyse zu stabilisieren.

Zur Beantwortung der Frage, ob m^1A in einer geschützten oder exponierten Stelle der $tRNA^{Phe}$ lokalisiert ist, wurde die Reduzierbarkeit von m^1A im Oktanucleotid mit der Reduzierbarkeit in der intakten tRNA verglichen. In einem parallel durchgeführten Experiment wurden $tRNA^{Phe}$ sowie das Oktanucleotid m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp mit $NaBT_4$ behandelt und anschließend von radioaktiven Verunreinigungen befreit (4.3). Dem reduzierten Oktanucleotid wurde anschließend unreduzierte $tRNA^{Phe}$ zugesetzt, um geeignete Referenzen im Chromatogramm zu haben. Nach vollständiger Spaltung mit T1-RNase wurden beide Proben chromatographiert (Abb. 9). Die Verteilung der Radioaktivität zeigt deutlich, daß m^1A in der $tRNA^{Phe}$ nicht, dagegen im Oktanucleotid vollständig reduziert wurde. Die beiden kleinen radioaktiven Gipfel, die etwas früher von der Säule eluiert wurden (Abb. 9 B), sind wahrscheinlich das entsprechende Cyclophosphat bzw. ein Bruchstück des Oligonucleotids

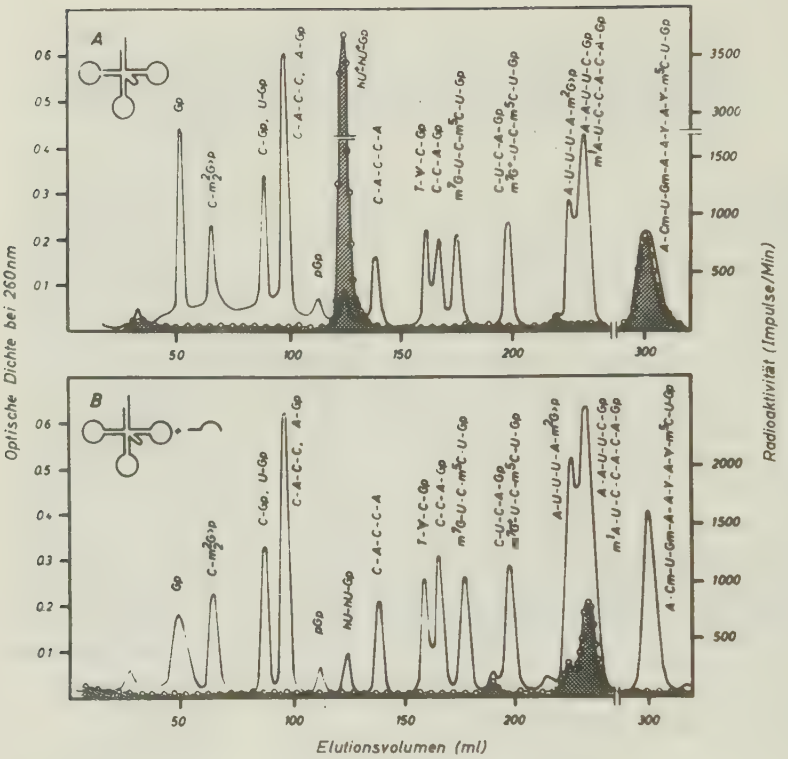


Abbildung 9: Chromatographie der T1-RNase-Spaltprodukte von (A) $NaBT_4$-reduzierter $tRNA^{Phe}$ und (B) $NaBT_4$-reduziertem m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp, dem unbehandelte $tRNA^{Phe}$ zugesetzt wurde. Etwa 15 A_{260}-Einheiten Oligonucleotidmaterial wurden auf je eine 0.3 x 100 cm DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur mit einem linearen NaCl-Gradienten (2 x 200 ml 0.01 und 0.3 M in 0.01 M Tris-Acetat, pH 5.5, 7 M Harnstoff) eluiert. 1 ml Fraktionen wurden aufgefangen. ———, Optische Dichte bei 260 nm; o——o, Radioaktivität von 0.2 ml Anteilen in 5 ml Bray-Szintillator (punktierte Bereiche).

Das Elutionsdiagramm bei pH 5.5 (Abb. 9) unterscheidet sich von dem bei pH 7.5 (58). Aus diesem Grunde mußten sämtliche Oligonucleotide analysiert werden. Sie konnten durch die R_{Up}-Werte bei der Papierelektrophorese und durch die UV-Spektren eindeutig identifiziert werden. Die 2. Tabelle enthält die Daten der Analyse.

Vollständige Reduktion von m^1A konnte auch in längeren Fragmenten der $tRNA^{Phe}$ beobachtet werden. Die 10. Abbildung zeigt die Elutionsdiagramme der CCA-Hälfte (A) bzw. eines 50 Nucleotide enthaltenden Fragments (B) nach der Reduktion mit $NaBT_4$ und vollständiger Spaltung mit T1-RNase. Es wäre von großem Interesse gewesen festzustellen, wie lang ein Fragment mindestens sein muß, um m^1A gegen die Reduktion zu schützen, wie es in der intakten $tRNA^{Phe}$ der Fall ist. Solche Fragmente stehen zur Zeit jedoch noch nicht zur Verfügung.

Nur unvollständig reduziert wurde m^1A in der CCA-Hälfte von $tRNA^{Phe}$, wenn diese Hälfte vor der Reduktion mit der komplementären pG-Hälfte kombiniert wurde (3. Tabelle). Dieser Befund zeigt, daß auch unter den Bedingungen der Reduktion (pH 9.8) sich der Komplex der beiden Hälften ausbilden kann. Er zeigt weiterhin deutlich, daß es ein Teil der pG-Hälfte ist, der den Schutz gegen die Reduktion ausübt oder induziert. Jedenfalls konnte mit diesem Versuch hinreichend gezeigt werden, daß der Schutz gegen die Reduktion ein Effekt der dreidimensionalen Struktur der $tRNA^{Phe}$ ist. Andere Reste, wie hU und Rib^+, die in exponierten Stellen des Makromoleküls lokalisiert sind, wurden auch im Komplex der $tRNA^{Phe}$-Hälften vollständig reduziert.

Die Radioaktivität enthaltende Fraktion des Elutionsdiagramms in Abbildung 10 A wurde weitgehend analysiert. Durch die Analysen sollte gesichert werden, daß die gesamte Radioaktivität im m^1A^+ lokalisiert ist. Anlaß zu diesem Schritt lieferten die Untersuchungen an dem m^7G enthaltenden Hexanucleotid, wo nach Behandlung mit $NaBT_4$ der überwiegende Teil der Radioaktivität in

Oligonucleotide	R_{Up} pH 2.7	pH 3.5	λmax	250/260	280/260	290/260
Gp	0.53		253 256	1.10 0.89	0.65 0.65	0.27 0.45
C-m_2^2G›p	0.56		262 269	0.82 0.56	0.67 0.99	0.45 0.74
U-Gp	0.89		256 258	0.97 0.85	0.51 0.51	0.19 0.29
C-Gp	0.56		255 277	1.03 0.77	0.74 1.10	0.33 0.87
A-Gp	0.47	0.63	256 257	0.97 0.89	0.39 0.44	0.16 0.25
C-A-C-C	-0.32		266 274	0.75 0.61	0.77 1.22	0.36 0.84
pGp	1.02		253 -	1.13 -	0.68 -	0.31 -
hU^+-hU^+-Gp	-		-	-	-	-
C-A-C-C-A	-0.24		262 268	0.78 0.69	0.58 0.92	0.27 0.60
T-Ψ-C-Gp	0.91		261 265	0.85 0.73	0.68 0.82	0.31 0.49
C-C-A-Gp	0.39		259 268	0.89 0.75	0.75 0.92	0.43 0.63
m^7G-U-C-m^5C-U-Gp	0.60	0.87	259 262	0.88 0.77	0.67 0.80	0.39 0.58
C-U-C-A-Gp	0.57		259 263	0.88 0.76	0.64 0.80	0.32 0.52
A-U-U-U-A-m^2G›p	0.73		258 259	0.87 0.82	0.37 0.37	0.13 0.15
A-A-U-U-C-Gp	0.89	0.89	258 259	0.87 0.81	0.41 0.46	0.15 0.22
m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp	0.66	0.61	258 260	0.85 0.79	0.50 0.60	0.22 0.35

Tabelle 2: Analysendaten der T1-RNase-Spaltprodukte von $tRNA^{Phe}$. Die spektralen Eigenschaften der Oligonucleotide wurden in Eluaten der Papierelektrophorese bestimmt (gemessen gegen entsprechende Blindwerte). Obere Zeile: Messung in Wasser; untere Zeile: Messung in 0.02 M HCl.

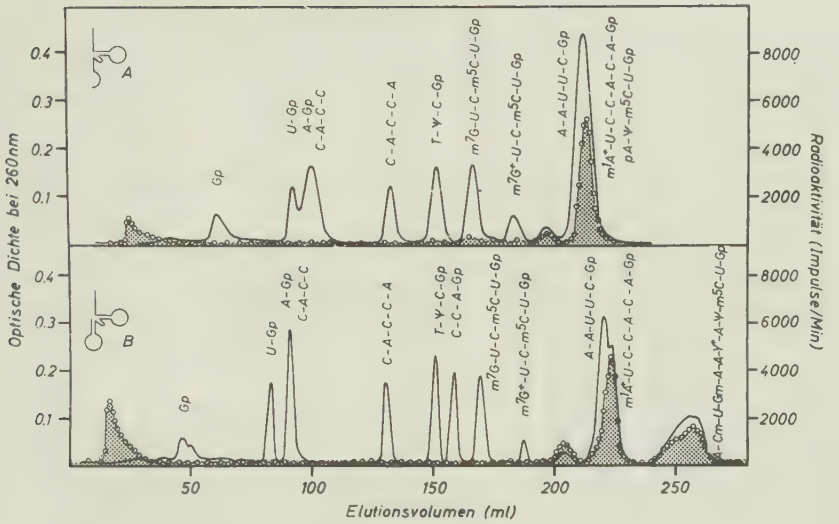


Abbildung 10: Elutionsdiagramme von der CCA-Hälfte der $tRNA^{Phe}$ (A) und einem Fragment der $tRNA^{Phe}$, das 50 Nucleotide (Nr.27-76) enthält (B), nach Behandlung mit $NaBT_4$ und vollständiger Spaltung mit T1-RNase. In beiden Fällen wurden etwa 8 A_{260}-Einheiten Nucleotidmaterial auf die Säulen aufgetragen und chromatographiert (siehe Bildunterschrift zu Abb. 9).

Abbauprodukten des reduzierten m^7G wiedergefunden wurde (2.6.3). Die Abbildung 11 zeigt, daß die Radioaktivität des reduzierten Oktanucleotids auch auf der Papierelektrophorese einheitlich wandert (11 A) und nach dem Abbau mit Pankreas-RNase das erwartete Dinucleotid liefert (11 B). Diese Befunde zeigen hinreichend, daß bei der Behandlung von m^1A enthaltenden Oligonucleotiden mit Natriumborhydrid unter Standardbedingungen das erwartete Reduktionsprodukt m^1A^+ entsteht ohne nennenswerte Mengen an Nebenprodukten.

Versuch Nr.	Fragment	Radioaktive Oligonucleotide (Impulse/Min)		^3H im Oligonucleotid (Mol/Mol)	
				gefunden	erwartet
1	CCA-Hälfte	reduziertes m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp	68 090	1.19	1
2	Gemisch der CCA-Hälfte mit der pG-Hälfte	reduziertes m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp	20 180	0.35	1
		reduziertes hU-hU-Gp	218 430	4	4
		reduziertes A-Cm-U-Gm-A-A-Rib^+	56 125	1.03	1
3	pG-Hälfte	reduziertes hU-hU-Gp	185 085	3.70	4
		reduziertes A-Cm-U-Gm-A-A-Rib^+	55 625	1.11	1

Tabelle 3: Reduktion der getrennten und kombinierten Hälften von $tRNA^{Phe}$ mit $NaBT_4$. 20.6 A_{260}-Einheiten CCA-Hälfte, 19.6 A_{260}-Einheiten pG-Hälfte und ein Gemisch von 16.4 A_{260}-Einheiten CCA-Hälfte mit 24.4 A_{260}-Einheiten pG-Hälfte wurden mit $NaBT_4$ reduziert und gereinigt (siehe Methoden). Nach Spaltung mit T1-RNase und Auftrennung auf DEAE-Cellulose-Säulen (siehe Methoden) wurde die Radioaktivität in den Oligonucleotiden bestimmt, die reduziertes m^1A, reduziertes hU und reduzierte, modifizierte Ribose enthielten. (Modifizierte Ribose = Rib^+ ist die 3'-Endgruppe der pG-Hälfte, wenn die Hälfte durch Anilinspaltung (35) von $tRNA^{Phe}$(HCl) (34) gewonnen wird.) Die Mole Tritium per Mol Oligonucleotid wurden aus den Radioaktivitäten bestimmt unter der Annahme, daß 4 Mole Tritium im reduzierten hU-hU-Gp des 2. Versuchs enthalten sind. Ferner wurde auf die molaren Mengen der wiedergewonnenen Oligonucleotide bezogen: Versuch 1: 31.1 nMole T-Ψ-C-Gp; Versuch 2: 29.1 nMole T-Ψ-C-Gp bzw. 29.7 nMole C-C-A-Gp und Versuch 3: 27.2 nMole C-Gp.

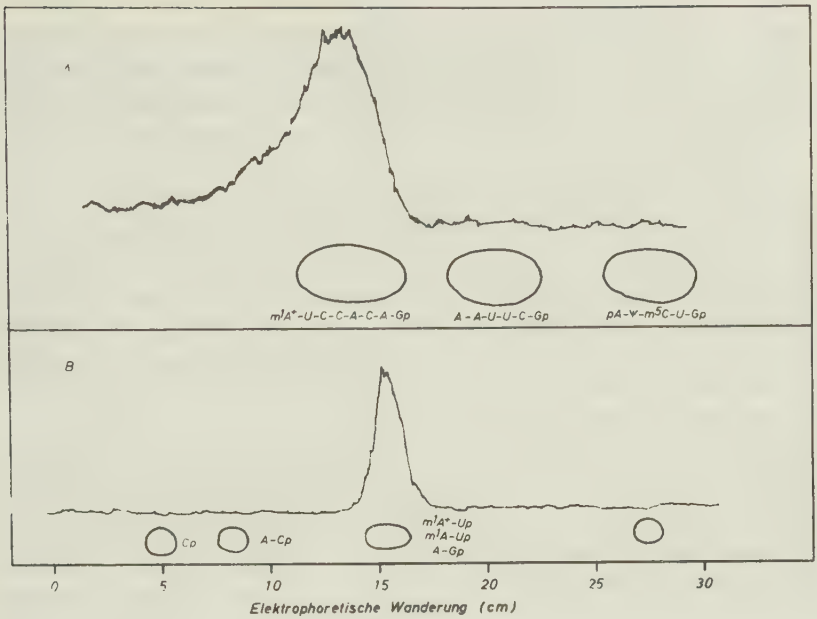


Abbildung 11: Analyse der radioaktiven Fraktion von Abbildung 10 A. Die radioaktive Oligonucleotid-Fraktion wurde auf Papierelektrophorese bei pH 3.5 aufgetrennt (A). Die gesamte Radioaktivität ist, wie erwartet, im reduzierten Oktanucleotid enthalten. Nach Spaltung mit Pankreas-RNase wurden die Mono- und Dinucleotide erneut auf Papierelektrophorese bei pH 3.5 aufgetrennt (B). Die gesamte Radioaktivität wanderte mit der m^1A^+ enthaltenden Fraktion. Der Fleck mit der elektrophoretischen Wanderung von 27.5 cm hatte kein charakteristisches UV-Spektrum und ist offensichtlich eine Verunreinigung.

2.6.3 Geschützte Nucleoside in der Phenylalanin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure. Untersuchungen über die Reduzierbarkeit von 7-Methylguanosin in der intakten Transfer-Ribonucleinsäure sowie in Fragmenten

Die Reduktion von m^7G mit $NaBH_4$ wurde etwa gleichzeitig in unserem und einem anderen Laboratorium untersucht (48). Nachdem die Reduktion von m^1A und m^3C bekannt wurde (46), mußte man aus Analogiegründen annehmen, daß m^7G ebenfalls reduzierbar ist. Die ersten Versuche brachten jedoch keine schlüssigen Ergebnisse, da über die Stabilität des Reduktionsproduktes keine Voraussagen gemacht werden konnten. Nach der Reduktion des Nucleosids und chromatographischer Reinigung der Produkte konnte nur die Ausgangsverbindung isoliert werden. Dieser Befund ließ vermuten, daß das Reduktionsprodukt m^7G^+ nicht stabil genug zur chromatographischen Analyse ist. Diese Vermutung konnte auch experimentell bestätigt werden, nämlich durch die photometrische Verfolgung des Reaktionsablaufs.

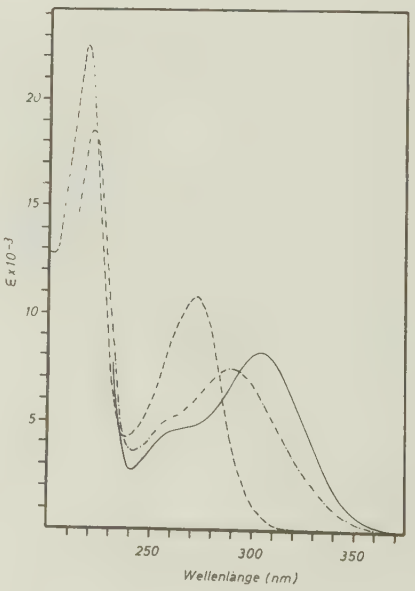


Abbildung 12: UV-Spektren von 8-Hydro-7-Methylguanosin. Die Reduktion von m^7G sowie sämtliche weitere Operationen wurden in entgasten, mit Argon gesättigten Puffern durchgeführt. Spektren: (——) in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.5; (-.-.) in 0.02 M $NaHCO_3$, pH 10.0; (---) in 0.02 M HCl.

Nach der Zugabe von $NaBH_4$ zu einer wässrigen m^7G-Lösung entsteht in wenigen Minuten ein Produkt mit den in der 12. Abbildung dargestellten UV-Spektren. In entgasten Puffern, die mit sauerstofffreiem Argon gesättigt wurden, ist das Produkt wenige Stunden haltbar. Es wurde die in Schema 1 gezeigte Formel für dieses Produkt vorgeschlagen; diese Formel wurde nicht streng bewiesen, ist aber sehr wahrscheinlich und im Einklang mit den Ergebnissen der Luftoxidation und dem Tritium-Austausch in Position 8 der Base. Wenn reduziertes m^7G (m^7G^+) mit Luftsauerstoff in Berührung kommt, verändert sich das UV-Spektrum: Es entsteht wieder die Ausgangsverbindung m^7G (Abb. 13).

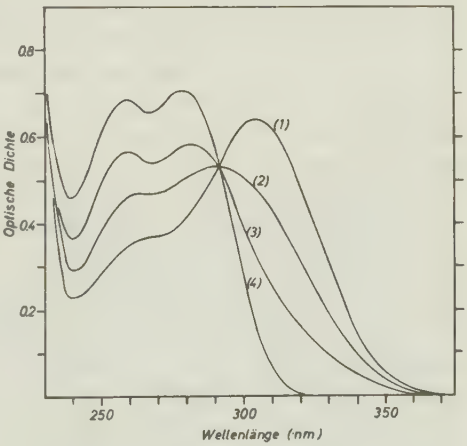


Abbildung 13: Luftoxidation von m^7G^+. Die Rückoxidation von reduziertem m^7G wurde in 0.02 M Tris/HCl, pH 7.5, gemessen. Die Spektren wurden aufgenommen: Vor der Sättigung der Lösung (1), 20 Min (2), 40 Min (3) und 3 Stunden (4) nach der Sättigung der Lösung mit Luftsauerstoff.

Bei der Reduktion mit radioaktivem Natriumborhydrid wurde an Hand von Schema 1 der Einbau von Tritium in m^7G^+ und nach der Luftoxidation auch in m^7G erwartet. Tatsächlich konnte in das Hexanucleotid m^7G-U-C-m^5C-U-Gp nach längerer Reduktionsdauer (20 Min bis 2 Stunden) bei pH 9.8 Radioaktivität eingebaut werden. Die Radioaktivität wanderte auf einer DEAE-Cellulose-Säule

und auf dem Papierelektropherogramm (Abb. 14 A) zusammen mit UV-absorbierendem Material. Nach der Spaltung mit Pankreas-RNase zeigte sich jedoch, daß die Radioaktivität zum größten Teil nicht im m^7G, sondern in Abbauprodukten ohne UV-Absorption eingebaut wurde (Abb. 14 B). Auch Pochon und Mitarbeiter (46) konnten Nebenprodukte bei der Reduktion von m^7G nachweisen. Da im m^7G selbst keine Radioaktivität in nennenswerten Mengen wiedergefunden wurde, mußte ein schneller Protonen-Austausch in Position 8 angenommen werden. Der Austausch des Wasserstoffs in Position 8 von m^7G wurde mittlerweile experimentell gesichert (59).

Wegen der Labilität des reduzierten m^7G konnte die Frage, ob m^7G in $tRNA^{Phe}$ geschützt oder ungeschützt ist, nicht durch Nucleotidanalyse (wie im Fall von m^1A) beantwortet werden. Vielmehr eignete sich hierfür der photometrische Nachweis. Da in der $tRNA^{Phe}$ nur Y eine Absorption bei 310 nm hat, sollte die Reduktion des m^7G oder, technisch einfacher, die Rückoxidation des reduzierten m^7G leicht nachweisbar sein. Die Reoxidationsgeschwindigkeiten für reduziertes m^7G, m^7G-U-C-m^5C-U-Gp und CCA-Hälfte von $tRNA^{Phe}$ waren sehr ähnlich, unabhängig davon, ob die Reduktion bei Raumtemperatur oder bei 80° durchgeführt wurde (Abb. 15). Wenn $tRNA^{Phe}$ bei Raumtemperatur reduziert wurde, änderte sich die Absorption bei 310 nm nicht unter Rückoxidationsbedingungen (Abb. 15 A). Daraus muß geschlossen werden, daß $tRNA^{Phe}$ gar nicht reduziert wurde. Das bedeutet wiederum, daß m^7G in der $tRNA^{Phe}$ an einer geschützten Stelle lokalisiert ist. Bei 80° dagegen, wo die dreidimensionale Struktur der $tRNA^{Phe}$ entfaltet ist, konnte m^7G reduziert und die Rückoxidation gemessen werden.

Die Kurven der Abbildung 15 zeigen erhebliche Abweichungen voneinander. Dies betrifft sowohl die Halbwertszeiten als auch die absolute Größe der A_{310}-Werte. Besonders auffällig ist die Streuung, wenn die Reduktion bei 80° durchgeführt wurde. Bedenkt man jedoch, daß bei dieser Methode sehr geringe Differenzen relativ hoher Extinktionen gemessen wurden, ist die Streuung

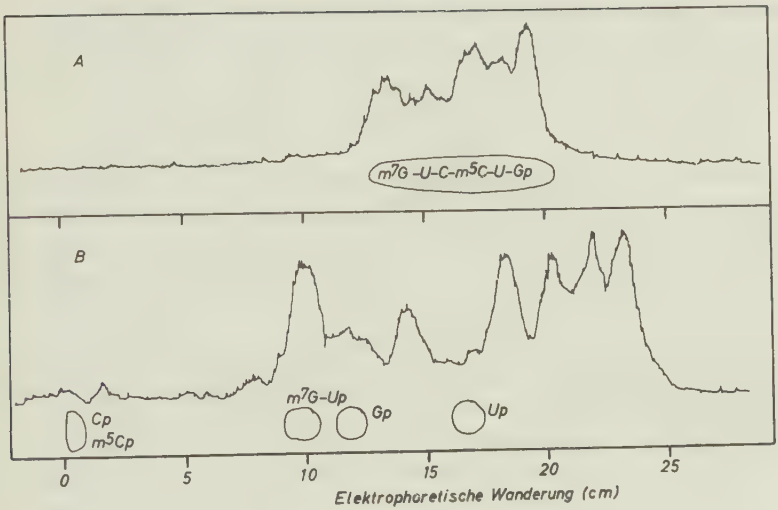


Abbildung 14: Analyse des Hexanucleotids m^7G-U-C-m^5C-U-Gp nach Behandlung mit $NaBT_4$. Reduziertes Hexanucleotid wurde nach chromatographischer Reinigung (siehe Methoden) 5 Stunden gegen Wasser dialysiert und durch Gefriertrocknen eingeengt. Aus der Verteilung der Radioaktivität auf dem Papierelektropherogramm (A) ist ersichtlich, daß bei der Reduktion mehrere Abbauprodukte entstanden sind. Dies wird nach der Spaltung des Hexanucleotids mit Pankreas-RNase noch deutlicher (B). Aus m^7G sind Produkte ohne UV-Absorption entstanden. Neben einigen dieser Abbauprodukte vermag Pankreas-RNase offensichtlich die Zucker-Phosphat-Kette zu spalten.

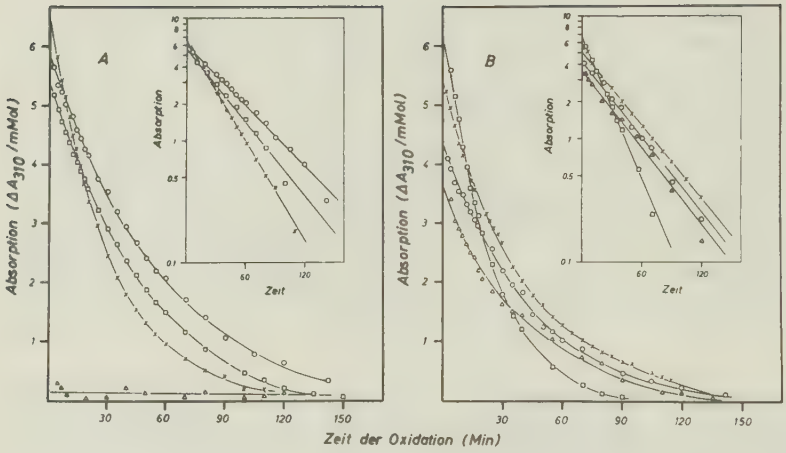


Abbildung 15: Kinetik der Rückoxidation von reduziertem m^7G. Die Reduktion wurde bei pH 9.8 entweder bei Raumtemperatur (A) oder bei 80° (B) durchgeführt. Die Reduktionszeiten bei Raumtemperatur waren 5 Min für m^7G, 15 Min für das Oligonucleotid m^7G-U-C-m^5C-U-Gp, 1 Stunde für die CCA-Hälfte und zwei Stunden für $tRNA^{Phe}$. Bei 80° betrug die Reduktionszeit einheitlich 2 Min. Die Rückoxidation von m^7G wurde durch die Abnahme der Absorption bei 310 nm verfolgt (Methoden). (▫——▫) m^7G, (x——x) Hexanucleotid, (○——○) CCA-Hälfte und (△——△) $tRNA^{Phe}$. Die A_{310}-Werte für $tRNA^{Phe}$ und für die CCA-Hälfte wurden um einen Faktor von 1.37 korrigiert, da diese Verbindungen an Hand von Analysen nur 73% m^7G und 27% des alkalischen Umwandlungsproduktes von m^7G (82) enthielten.

nicht überraschend. Da auch die Menge des gelösten Sauerstoffs im Puffer nicht genau zu kontrollieren ist, sind die Abweichungen der Halbwertszeiten ebenfalls nicht verwunderlich. Bei 80° Reduktionstemperatur sind zusätzlich die Nebenreaktionen der Reduktion mit $NaBH_4$ schlechter zu kontrollieren.

Reduziertes m^1A ist unter den Bedingungen der Rückoxidation von m^7G mindestens 18 Stunden stabil. Somit war eine Störung bei der Messung der Rückoxidation von m^7G^+ durch m^1A^+ nicht zu erwarten. Wurde die Reaktion jedoch bei 80° durchgeführt, konnte nicht mit Sicherheit vorausgesagt werden, ob aus m^1A dasselbe Produkt entsteht wie bei Raumtemperatur. Tatsächlich entstand bei 80° und pH 9.8 nicht das erwartete m^1A^+ (mit einem Absorptionsmaximum bei 295 nm), sondern ein Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 261 nm. Die Substanz wurde nicht eingehend analysiert, es handelt sich aber höchst wahrscheinlich um m^6A. Bei 310 nm hatte dieses Produkt keine Absorption.

Wenn die Reduktion mit $tRNA^{Phe}$(HCl) statt mit $tRNA^{Phe}$ durchgeführt wurde, so war ein nicht ganz klar zu deutender Effekt bemerkbar. Unter Rückoxidationsbedingungen verhielt sich die $tRNA^{Phe}$(HCl) die ersten zwei Stunden ähnlich wie die $tRNA^{Phe}$. Dann zeigte sich jedoch ein langsamer linearer Abfall der Absorption bei 310 nm. Dieser Abfall hielt u.U. bis zu 14 Stunden an. Die Geschwindigkeit dieser Absorptions-Abnahme betrug nur etwa 4% der Oxidationsgeschwindigkeit von m^7G^+. Eine mögliche Deutung, daß nämlich unter Reduktionsbedingungen (pH 9.8) eine denaturierte Form der $tRNA^{Phe}$(HCl) vorliegt und in dieser Form m^7G exponiert ist, unter den Rückoxidationsbedingungen (pH 7.0), wo die $tRNA^{Phe}$(HCl) in der nativen Konformation vorliegt, m^7G^+ nunmehr gegen die Rückoxidation partiell geschützt ist, konnte durch eine Kontrolle ausgeschlossen werden. Der Abfall bei 310 nm wurde nämlich auch dann beobachtet, wenn die $tRNA^{Phe}$(HCl) bei pH 7.0 reduziert wurde (unter diesen Bedingungen wird das Nucleosid m^7G in 5 Minuten vollständig reduziert). Eine befriedigende Erklärung konnte für diesen Effekt nicht gefunden werden; es

erscheint jedoch als sehr unwahrscheinlich, daß er mit der Reduktion und Rückoxidation von m^7G in Verbindung steht.

2.7 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der dreidimensionalen Struktur der tRNA

Ein Teil der gestellten Fragen hinsichtlich der Selektivität und der quantitativen Seite der $NaBH_4$-Reduktion seltener Nucleoside in der tRNA konnte an Hand der beschriebenen Analysen beantwortet werden. $NaBH_4$ ist ein schonendes Reagens und deshalb zur chemischen Modifizierung der tRNA gut geeignet. Wenn die Reaktion unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurde, ist in $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Tyr}$ nur hU, in $tRNA^{Phe}$ hU und zum Teil Y reduziert worden. Sonstige Nebenreaktionen oder Kettenbrüche lagen unter der Nachweisgrenze, die mit 2 - 10% angegeben werden kann.

Einige der reduzierbaren Nucleoside (Schema 1) wurden unter Standardbedingungen der $NaBH_4$-Reduktion nicht angegriffen. Diese (ac^4C, m^1A und m^7G) sind offenbar in geschützten Positionen der tRNA lokalisiert. In Fragmenten der tRNA hingegen (z.T. langen Fragmenten, wie die CCA-Hälfte der $tRNA^{Phe}$ bzw. ein Fragment, das etwa 2/3 der Nucleoside der $tRNA^{Phe}$ enthält), wurden alle drei genannten, in der intakten tRNA geschützten Nucleoside reduziert. Dies bedeutet, daß der Schutz der Nucleoside gegen die Reduktion spezifisch ist, d.h. durch die besondere Struktur der tRNA bewirkt wird.

Alle 15 tRNAs, deren Nucleotidsequenz ermittelt wurde, lassen sich zu zweidimensionalen Kleeblättern mit für alle tRNAs charakteristischen Merkmalen falten (11). Die Richtigkeit der Kleeblattmodelle ist durch Experimente zwar nicht bewiesen, muß aber aus statischen Gründen als sicher angenommen werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß sich 15 beliebige Nucleotidsequenzen mit einer Kettenlänge zwischen 75 - 85 zu Kleeblattmodellen mit so ausgeprägt regelmäßigen Eigenschaften falten lassen, ist geringer als 1 zu 10^{20} (60). Einige Ergebnisse der $NaBH_4$-Reduktion

sind im Einklang mit den Kleeblattmodellen und können als experimentelle Stütze der Modelle gewertet werden. Die Tatsache, daß ac^4C in der $tRNA^{Ser}$ durch $NaBH_4$ unter den Standardbedingungen nicht reduzierbar und deswegen geschützt ist, entspricht den Erwartungen. Dieses Nucleosid ist in einem gepaarten Bereich der Kette lokalisiert (Abb. 1). Die geringe Reaktivität doppelsträngiger Bereiche mit Endonucleasen (61-66) und auch gegenüber chemischen Agentien (26-28,30,50,51) ist eine gesicherte Tatsache. Die leichte und quantitative Reduzierbarkeit der hU-Reste in drei verschiednen tRNAs und die Modifizierung von Y in $tRNA^{Phe}$ sind ebenfalls in gutem Einklang mit den Kleeblattmodellen. Diese Nucleoside sind in einsträngigen Bereichen lokalisiert und sollten demnach auch chemisch modifizierbar sein. Nicht in Einklang mit den Kleeblattmodellen können die Befunde mit m^1A und m^7G gebracht werden. Beide Nucleoside sind in einsträngigen Bereichen der $tRNA^{Phe}$ lokalisiert (Abb. 1). Die Tatsache, daß diese Nucleoside durch $NaBH_4$ unter Standardbedingungen nicht angreifbar sind und deswegen in geschützten Positionen der $tRNA^{Phe}$ lokalisiert sein müssen, läßt jedoch gewisse Schlüsse über ihre Rolle in der dreidimensionalen Struktur der $tRNA^{Phe}$ zu.

An Hand der Ergebnisse physikalischer Messungen ist es sicher, daß die tRNAs eine kompakte, dreidimensionale Struktur besitzen (Übersicht, Ref. 33). Aus den Daten der Kleinwinkelstreuung an tRNA-Molekülen in wässriger Lösung und aus Daten der Röntgenstrukturanalyse an tRNA-Kristallen ist eine ellipsoide Form der tRNA-Struktur wahrscheinlich gemacht worden (Übersicht, Ref. 67). Dreidimensionale tRNA-Modelle, die hinsichtlich ihrer räumlichen Dimensionen mit den Meßdaten der Kleinwinkelstreuung und Röntgenstrukturanalyse übereinstimmen, lassen sich durch Faltung und Fixierung einzelner Elemente der Kleeblätter konstruieren. Diese Art der Modell-Konstruktion, die von den Kleeblättern ausgeht, wird bevorzugt, da die Kleeblätter als Elemente der dreidimensionalen tRNA-Struktur statistisch gesichert sind. Das Problem besteht in der Fixierung eines stabilen dreidimensionalen Gebildes. Die Bildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken zwischen

Bereichen der tRNA, die im Kleeblattmodell nicht gepaart sind, das coplanare Übereinanderlagern der Basen ("stacking") und Wechselwirkungen hydrophober Gruppen werden als Träger der stabilen tRNA-Struktur diskutiert (60).

Einige seltene Nucleoside könnten auf eine andere Weise zur Stabilität der dreidimensionalen Struktur der tRNA beitragen. m^1A und m^7G, die unter physiologischen Bedingungen je eine positive Ladung tragen, sind befähigt, mit negativen Gruppen, wie den Phosphaten der Kette, in Wechselwirkung zu treten. In hydrophober Umgebung, wo die abschirmende Wirkung der Hydrathülle nicht zur Geltung kommt, könnten solche heteropolare Kräfte einen erheblichen Beitrag zur Stabilisierung der Struktur der tRNA liefern. Es wurde postuliert (47), daß die wesentliche Rolle der positiv geladenen methylierten Nucleoside in der tRNA möglicherweise darin besteht, gewisse Bereiche der dreidimensionalen Struktur durch heteropolare Bindungen zu stabilisieren.

Mehrere dreidimensionale tRNA-Modelle, die durch Faltung und Fixierung einzelner Elemente des Kleeblatts konstruiert wurden, sind in der Literatur beschrieben (Übersicht, Ref. 67). Die Ergebnisse der $NaBH_4$-Reduktion von m^1A und m^7G können mit diesen Modellen verglichen werden. Hierzu muß jedoch die Annahme gemacht werden, daß der Schutz einzelner Nucleoside der Kette gegen chemische Modifizierung dadurch zustande kommt, daß diese entweder an stabilen Wechselwirkungen mit anderen Gruppen teilnehmen oder aber derart im "Innern" des Makromoleküls liegen, daß der Zutritt von Wasser und in Wasser gelösten Reagentien verhindert wird. Das Modell von Cramer und Mitarbeitern (26) trägt den Ergebnissen der $NaBH_4$-Reduktion mit m^1A und m^7G in der $tRNA^{Phe}$ nicht voll Rechnung. Sowohl m^1A als auch m^7G sind in diesem Modell "frei" und sollten deshalb reduzierbar sein. Im Modell von Levitt (60), das für $tRNA^{fMet}_{coli}$ konstruiert wurde, ist das dem m^1A in der $tRNA^{Phe}$ entsprechende A durch Wasserstoffbrücken gebunden und sollte daher geschützt sein. m^7G dagegen geht auch hier keine Bindungen ein, sollte daher nach diesem Modell reduzierbar sein. Im $tRNA^{Val}_{coli}$-Modell von Ninio und Mitar-

beitern (68) ist das dem m^1A in $tRNA^{Phe}$ entsprechende A und m^7G ungeschützt. Das Modell von Connors und Mitarbeitern (69) sowie weitere Modelle (Übersicht, Ref. 67) sind nicht genügend definiert und können mit diesen Ergebnissen nicht verglichen werden. Keines der erwähnten Modelle konnte voraussagen, daß m^7G geschützt ist, und keines der Modelle setzt eine definierte Funktion dieser methylierten Nucleoside in der dreidimensionalen Struktur der tRNA voraus. Um den Ergebnissen der Reduktion mit $NaBH_4$ gerecht zu werden, müssen sämtliche Modelle revidiert und verbessert werden.

3. Biologische Aktivitäten von Transfer-Ribonucleinsäure nach Reduktion mit Natriumborhydrid

3.1 Aminosäure-Akzeptoraktivität

Die Abhängigkeit der Akzeptoraktivitäten von der Reduktionszeit wurde an unfraktionierter tRNA und an angereicherten tRNA-Präparaten untersucht. Für $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Tyr}$, $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Ala}$ war bis zu einer Reduktionsdauer von 6 Stunden in der Beladbarkeit kein Unterschied zu den Kontrollen zu beobachten (Abb. 17). Dieser Befund wurde so gedeutet, daß die hU-Reste in diesen tRNAs sowie Y in $tRNA^{Phe}$ nicht wesentliche Bestandteile der Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Erkennungsregion sind.

Als Folge der $NaBH_4$-Behandlung von unfraktionierter tRNA nahm die Valin-Akzeptoraktivität gelegentlich um 35% ab (Abb. 17). Eine mögliche Erklärung für eine partielle Abnahme der Akzeptoraktivität wäre, wenn durch die Reduktion nur eine minore $tRNA^{Val}$-Komponente die Akzeptoraktivität verliert. Mehrere Gipfel der Akzeptoraktivität für $tRNA^{Val}$ wurden nach Fraktionierung mittels Gegenstromverteilung (70) oder Säulenchromatographie (71) beobachtet. Chromatographie von unfraktionierter tRNA nach Lagerkvist (72) lieferte mindestens zwei Akzeptoraktivitäts-Maxima für $tRNA^{Val}$ (Abb. 18). Vier Randfraktionen (Pfeile in Abb. 18) wurden mit $NaBH_4$ behandelt, und die Akzeptoraktivität in Abhängigkeit von der Reduktionsdauer gemessen. Kein nennenswerter

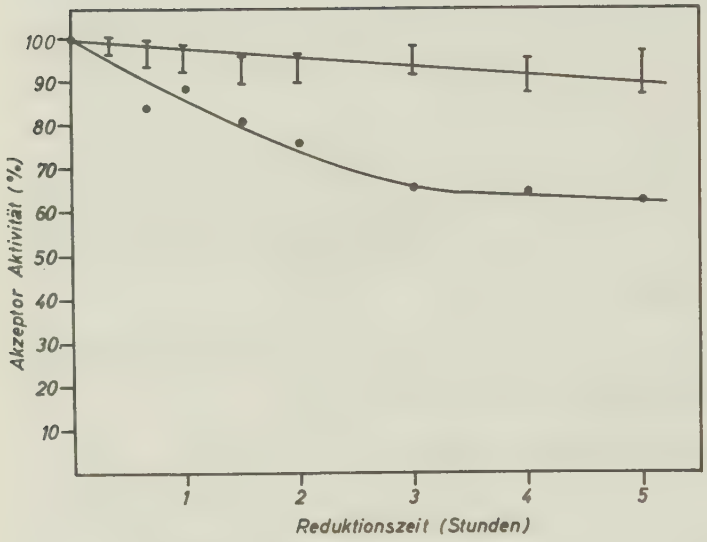


Abbildung 17: Akzeptoraktivität von tRNA nach Behandlung mit $NaBH_4$. Unfraktionierte tRNA wurde, wie unter Methoden beschrieben, reduziert. Die Akzeptoraktivitäten für Ser, Phe, Tyr und Ala, der reduzierten Proben sowie der Kontrollen lagen innerhalb der Fehlerfahnen. Die Kontrollen für Valin lagen ebenfalls im selben Bereich; die Valin-Akzeptoraktivitäten der reduzierten Proben wurden mit ●——● gekennzeichnet. Die absoluten Akzeptoraktivitäten in $pMol/A_{260}$-Einheit waren 60, 61, 41, 84 und 105 für Ser, Phe, Tyr, Ala bzw. Val.

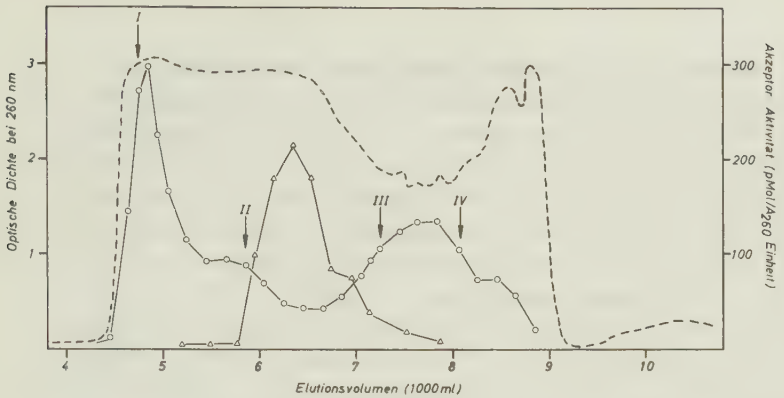


Abbildung 18: Fraktionierung von tRNA. Die Chromatographie von unfraktionierter tRNA auf DEAE-Cellulose erfolgte bei 4° nach Lagerkvist (72). o——o, Valin-Akzeptoraktivität; Δ——Δ, Tyrosin-Akzeptoraktivität; ---, optische Dichte.

Unterschied konnte bei dem Vergleich der Fraktionen festgestellt werden (4. Tabelle). Insgesamt war sogar die Abnahme der Akzeptoraktivitäten geringer als mit unfraktionierter tRNA.

Reduktionszeit (Stunden)		0	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	2.5	3	4	5	6
Akzeptoraktivität der multiplen $tRNA^{Val}$-Fraktionen	I	100	99	99	98	95	90	90	88	82	-	73	71
	II	100	99	91	96	92	92	110	94	94	87	83	86
	III	100	101	102	97	93	94	92	91	87	85	88	85
	IV	100	98	93	97	95	92	103	83	88	82	81	78

Tabelle 4: Akzeptoraktivitäten der multiplen $tRNA^{Val}$-Komponenten in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit $NaBH_4$. Die Akzeptoraktivitäten sind in % der nicht reduzierten Fraktionen angegeben. Die absoluten Einbauwerte können der 18. Abbildung entnommen werden.

Unter veränderten Bedingungen konnte eine Abnahme der Valin-Akzeptoraktivität von unfraktionierter tRNA um 90% beobachtet werden (Abb. 19). In diesen Versuchen wurde die $NaBH_4$-Konzentration bei der Reduktion auf 100 mg/ml erhöht und die Reaktion nicht durch Zugabe von Essigsäure beendet, sondern umgekehrt: Die Reaktionslösung wurde in die vorgelegte Säure pipettiert. Zur Kontrolle wurde die Serin-Akzeptoraktivität getestet, die sich auch unter diesen Bedingungen wie sonst verhielt. Die Hemmung der Akzeptoraktivität für Valin konnte wieder nahezu vollständig aufgehoben werden, wenn die tRNA vor dem Test durch Chromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule gereinigt wurde. Anscheinend entstand unter den Reduktions- oder Aufarbeitungsbedingungen ein Hemmstoff der Valyl-tRNA-Synthetase, der durch Chromatographie wieder entfernt werden konnte.

Die Frage, ob die Reduktion von m^1A die Akzeptoraktivität von $tRNA^{Phe}$ beeinflußt, konnte nicht an ganzer tRNA untersucht werden, da m^1A als Glied der intakten $tRNA^{Phe}$ unter milden Bedingungen nicht reduziert wird. In der CCA-Hälfte von $tRNA^{Phe}$ wird m^1A leicht reduziert. Deswegen wurde von der Beobachtung Gebrauch gemacht, daß das Gemisch der komplementären Hälften der $tRNA^{Phe}$ gute Akzeptoraktivität besitzt (35). Die Akzeptoraktivität wurde in Gemischen der pG-Hälfte mit steigenden Mengen der reduzierten bzw. nicht reduzierten CCA-Hälfte untersucht (Abb. 20). Dadurch, daß $NaBT_4$ zur Reduktion verwendet wurde, und die Tritium- bzw. ^{14}C-Radioaktivität des Phenylalanins auf den Filtern gleichzeitig bestimmt wurde, konnte festgestellt werden, daß m^1A^+ während des Einbautests vollkommen stabil war und nicht wieder oxidiert wurde. Im Einbautest zeigten die Gemische mit reduzierter CCA-Hälfte dieselbe Phenylalanin-Akzeptoraktivität wie die Gemische mit nicht reduzierter CCA-Hälfte (Abb. 20). Somit kann ausgeschlossen werden, daß m^1A ein wesentlicher Bestandteil der Synthetase-Erkennungsregion ist.

Um mögliche kleine Veränderungen der Akzeptoraktivitäten von reduzierten tRNAs zu sehen, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Aminoacylierung von reduzierter bzw. nicht reduzierter

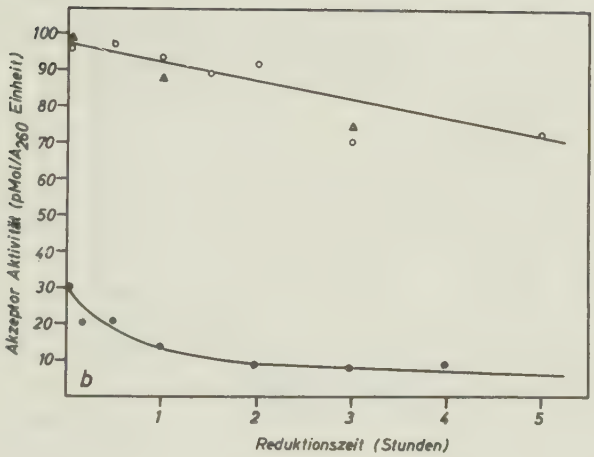


Abbildung 19: Valin-Akzeptoraktivität von tRNA nach Behandlung mit $NaBH_4$. Für die Reduktion siehe Methoden und Text. Anteile der reduzierten tRNA wurden an DEAE-Cellulose-Säulen (1 x 10 cm, 4°, lineare NaCl-Gradienten: 2 x 300 ml 0.1 und 1.5 M in 0.01 M Natriumacetat, pH 6.5, 5 mM $MgCl_2$) chromatographiert. ●——●, reduzierte tRNA; o——o, Kontrolle, enthielt "zerstörtes Natriumborhydrid"; ▲——▲, reduzierte tRNA nach Chromatographie.

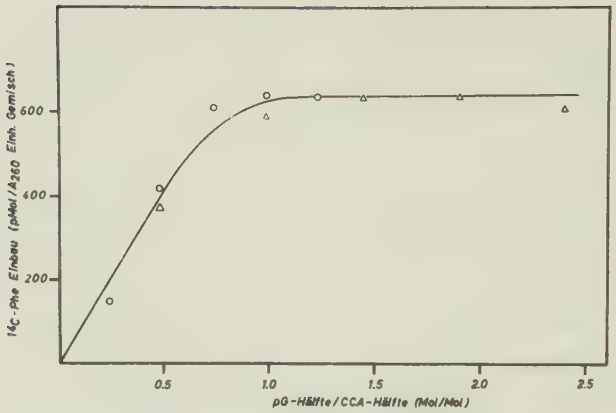


Abbildung 20: Akzeptoraktivität der $tRNA^{Phe}$-Hälften. Inkubationsgemische enthielten 0.05 A_{260}-Einheiten nicht reduzierte pG-Hälfte sowie steigende Mengen reduzierte (Δ——Δ) und nicht reduzierte (o——o) CCA-Hälfte. Wie erwartet, wurde ein Plateau erreicht, wenn das Verhältnis der A_{260}-Einheiten der Hälften 1 erreichte. Bei diesem Punkt war der ^{14}C-Phe-Einbau etwa 50% des Phe-Einbaus in $tRNA^{Phe}$ unter Standardbedingungen (Methoden). Die Inkubation wurde 30 Min bei 37° mit einer angereicherten Phenylalanyl-tRNA-Synthetase-Präparation durchgeführt.

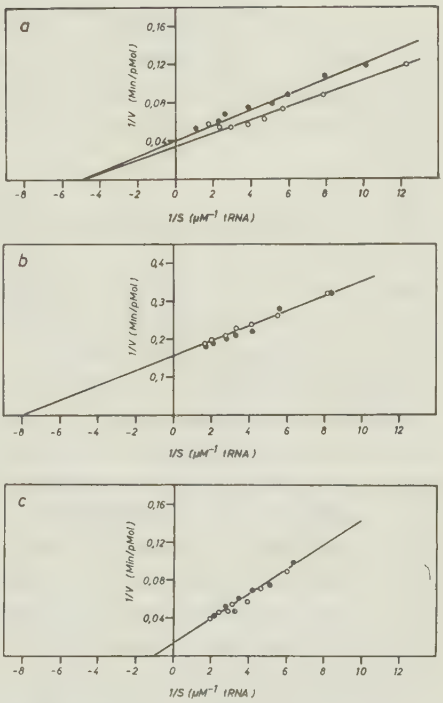


Abbildung 21: Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten des Aminosäure-Einbaus in reduzierte tRNAs und Kontrollen in Lineweaver-Burk-Diagrammen. Die Bedingungen wurden so gewählt, daß der Aminosäure-Einbau linear von der Enzymmenge wie von der Inkubationszeit abhing. (A) Serin-Einbau in angereicherte $tRNA^{Ser}$ (950 pMole/A_{260}-Einheit). Die Inkubation wurde im Standard-Inkubationsgemisch (Methoden) 1 Min bei 37° mit 4 x 10^{-6} A_{280}-Einheiten einer 200-fach angereicherten Seryl-tRNA-Synthetase-Präparation durchgeführt. Ein K_M von 2 x 10^{-7} M wurde ermittelt. (B) $tRNA^{Phe}$-Fraktionen (1100 pMole/A_{260}-Einheit) wurden nach Reduktion bzw. nach Alkalibehandlung (Methoden) der Kontrollen über Sephadex G-100 chromatographiert. Die Gipfelfraktionen wurden 2 Min bei 37° mit 6 x 10^{-6} A_{280}-Einheiten einer 200-fach angereicherten Phenylalanyl-tRNA-Synthetase-Präparation inkubiert (Methoden). Ein K_M von 1 x 10^{-7} wurde ermittelt. (C) Tyrosin-Einbau in unfraktionierte tRNA (40 pMole/A_{260}-Einheit). Die Inkubation wurde im Standard-Inkubationsgemisch (Methoden) 1 Min bei 37° mit 0.025 A_{280}-Einheiten einer unfraktionierten Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Präparation durchgeführt. Ein K_M von 1 x 10^{-6} M wurde erhalten. o——o, reduzierte tRNA; ●——●, Kontrolle.

$tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Tyr}$ gemessen. Aus der 21. Abbildung ist leicht zu entnehmen, daß die Unterschiede der Beladungsgeschwindigkeiten der reduzierten tRNAs und der Kontrollen gering sind und im Bereich der Fehlergrenzen des Versuches liegen.

3.2 Bindungsaktivität an das Ribosom

Reduzierte $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Tyr}$ und $tRNA^{Val}$ wurden im poly (U,C), poly U, U-A-U bzw. poly (U,G) stimulierten Bindungstest nach Nirenberg und Leder (73) mit nicht reduzierten Kontrollen verglichen. In ihrer Bindungskapazität an E. coli-Ribosome konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 22). Dieser Befund ist speziell im Fall von $tRNA^{Phe}$ interessant, in der auch das seltene Nucleosid Y reduziert wurde. Im Gegensatz zur Reduktion hat das Herausspalten von Y durch milde Säurebehandlung den vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit zur Folge (34). Möglicherweise verändert sich die Konformation des Anticodons nach dem Herausspalten von Y, durch die reduktive Modifizierung von Y jedoch nicht. Aus den gemeinsamen Ergebnissen der Modifizierung mit Säure und $NaBH_4$ kann angenommen werden, daß die Rolle des Y eher in der Aufrechterhaltung der Anticodon-Konformation liegt als in einer direkten spezifischen Wechselwirkung mit dem Ribosom.

3.3 Transferaktivität

Die Transferaktivität der $tRNA^{Ser}$, d.h. ihre Fähigkeit zur Übertragung des aktivierten Serins in die wachsende Peptidkette, wurde durch die Reduktion mit $NaBH_4$ nicht wesentlich beeinflußt. Mehr als die Hälfte der eingesetzten ^{14}C-Serin-Radioaktivität wurde sowohl von der reduzierten wie von der nicht reduzierten ^{14}C-Seryl-$tRNA^{Ser}$ in Polypeptid übertragen (5. Tabelle). Demnach sind die hU-Reste der $tRNA^{Ser}$ auch nicht wesentliche Bestandteile der Erkennungsregion für einen der "Transfer-Faktoren".

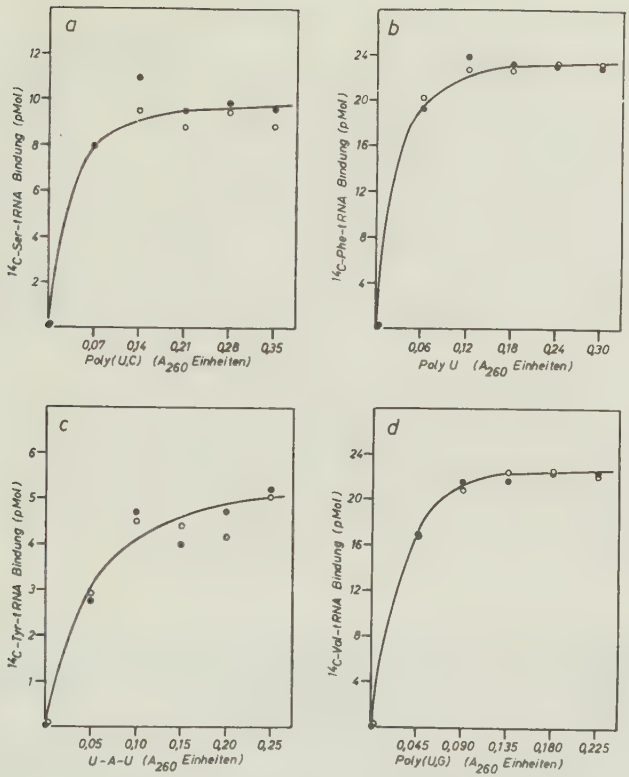


Abbildung 22: Bindung reduzierter Aminoacyl-tRNAs an Ribosome. Reine tRNAs wurden verwendet, o——o, reduziert; ●——●, Kontrolle. Die eingesetzten Mengen an Aminoacyl-tRNAs pro Inkubationsgemisch waren: (A) 20 pMole ^{14}C-Ser-tRNA^{Ser} (25% beladenes Präp.), (B) 47 pMole ^{14}C-Phe-tRNA^{Phe} (40% beladenes Präp.), (C) 109 pMole ^{14}C-Tyr-tRNA^{Tyr} (70% beladenes Präp.) und (D) 39 pMole ^{14}C-Val-tRNA^{Val} (80% beladenes Präp.). Blindwerte ohne Polymer bzw. Triplett (4.4 pMole für ^{14}C-Ser-tRNA^{Ser}, 2.5 pMole für ^{14}C-Phe-tRNA^{Phe}, 4.1 pMole für ^{14}C-Tyr-tRNA^{Tyr} und 6.5 pMole für ^{14}C-Val-tRNA^{Val}) wurden von allen Punkten abgezogen.

	^{14}C-Ser-tRNA^{Ser} (reduziert)				^{14}C-Ser-tRNA^{Ser} (Kontrolle)			
Inkubationszeit (Min)	10	20	40	40	10	20	40	40
In Polypeptid eingebaute Radioaktivität (Imp/Min)	405	570	587	602	664	720	630	530
% Transfer	38	53	55	56	71	77	68	57

Tabelle 5: Vergleich der Transferaktivität von reduzierter und nicht reduzierter tRNA^{Ser}. Die Inkubationsgemische (siehe Methoden) enthielten 1066 Imp/Min an ^{14}C-Ser-tRNA^{Ser} (reduziert) bzw. 930 Imp/Min an ^{14}C-Ser-tRNA^{Ser} (Kontrolle). Gemessen wurde die mit heißer Säure fällbare Radioaktivität nach den angegebenen Inkubationszeiten.

3.4 Cytidin-5'-Phosphat- und Adenosin-5'-Phosphat-Einbauaktivität von Transfer-Ribonucleinsäure nach limitiertem Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Die CMP-und AMP-Einbauaktivität von limitiert abgebauter tRNA (tRNA-C, siehe Abkürzungsverzeichnis) nach Behandlung mit $NaBH_4$ wurde nach zwei verschiedenen Methoden bestimmt. In einer Versuchsreihe wurde der Einbau von radioaktivem CMP gemessen; in der anderen Versuchsreihe der Einbau von radioaktiven Aminosäuren in die tRNA-C. Der Einbau der Aminosäuren ist nur möglich, wenn vorher CMP und AMP eingebaut wurden; CTP und ATP waren in nichtmarkierter Form in der Inkubationslösung im Überschuß vorhanden.

tRNA-C wurde durch limitierten Abbau von tRNA-C-C-A mit Schlangengift-Phosphodiesterase nach Zubay und Takanami (74) dargestellt. Sie hatte eine restliche Aminosäure-Akzeptoraktivität von 5 - 10% in Abwesenheit von CTP im Inkubationsgemisch und nahezu volle Akzeptoraktivität in Gegenwart von CTP. Es wurde nicht direkt bestimmt, wieviel CMP von der 3. Position vom 3'-Ende durch die Phosphodiesterase entfernt wurde.

Wenn der limitierte Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase an reduzierter tRNA versucht wurde, war der Abbau gelegentlich stark gehemmt (30 - 100%). Keine Hemmung des Abbaus wurde dagegen beobachtet, wenn die tRNA nach der Behandlung mit $NaBH_4$ durch Chromatographie über eine DEAE-Cellulose-Säule gereinigt wurde. Keine Komplikationen entstanden, wenn die Reduktion mit $NaBH_4$ erst nach dem limitierten Abbau mit der Phosphodiesterase durchgeführt wurde. Offenbar ist ein Hemmstoff der Phosphodiesterase während der Reduktion entstanden, welcher jedoch die CCA-Pyrophosphorylase nicht hemmt.

Nucleinsäure	^{3}H-CMP-Einbau (pMol/A_{260}-Einheit)		
	unbehandelt	Alkali-behandelt (pH 9.8)	$NaBH_4$-behandelt
tRNA-C	621	611	538
tRNA-C-C-A	22	41	27

Tabelle 6: ^{3}H-CMP-Einbau in tRNA ohne C-A-Ende. Pro Inkubationsgemisch wurden 0.11 A_{260}-Einheiten tRNA-C bzw. tRNA-C-C-A eingesetzt. Alkali-behandelte Fraktionen wurden, wie unter Methoden beschrieben, zur Kontrolle dargestellt. Die "unbehandelten" Fraktionen wurden weder mit Alkali noch mit $NaBH_4$ behandelt.

Aus den Ergebnissen der 6. und 7. Tabelle ist es offensichtlich, daß die Reduktion von tRNA-C keinen Einfluß auf die CMP- und AMP-Einbauaktivität hat. Die relativ niedrigen Werte für den CMP-Einbau der reduzierten sowie der Kontroll-Fraktionen (6. Tabelle) sind wahrscheinlich auf einen Fehler der spezifischen Radioaktivität des ^{3}H-CTP zurückzuführen. Es wurde nämlich eine hoch markierte ^{3}H-CTP-Lösung mit nicht markiertem CTP verdünnt. Da nicht die gesamte Radioaktivität mit Sicherheit im ^{3}H-CTP enthalten war (z.T. in ^{3}H-CDP und ^{3}H-CMP), kann beim Verdünnen der Lösung mit nicht radioaktivem CTP ein Fehler entstanden sein.

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der 6. und 7. Tabelle zusammen, dann kann der Schluß gezogen werden, daß sowohl die reduzierte wie die nicht reduzierte tRNA-C durch die CCA-Pyrophosphorylase voll rekonstituiert wurde. Demnach wurde durch die Reduktion kein wesentlicher Bestandteil der Erkennungsregion für die CCA-Pyrophosphorylase auf der tRNA-C verändert.

Aminosäure	Einbau von ^{14}C-Aminosäuren (% der entspr. tRNA-C-C-A)		
	unbehandelte tRNA-C	Alkali-behandelte tRNA-C	$NaBH_4$-behandelte tRNA-C
Serin	89	91	90
Tyrosin	87	76	87
Phenylalanin	100	99	100
Alanin	89	82	97
Valin	83	74	87

Tabelle 7: ^{14}C-Aminosäure-Einbau in tRNA ohne C-A-Ende. Die 100%-Werte wurden mit tRNA-C-C-A-Fraktionen bestimmt, die genauso wie die tRNA-C-Fraktionen behandelt wurden; (nicht behandelt, mit Alkali bei pH 9.8 behandelt bzw. reduziert). Die absoluten Einbauwerte in pMol/A_{260}-Einheit waren für die unbehandelten tRNAs: Ser (61), Tyr (41), Phe (60), Ala (84) und Val (105). Für die Alkali-behandelten bzw. reduzierten Proben lagen die Werte 5 - 10% niedriger.

3.5 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Enzym-Erkennungsregionen der tRNA

Durch die Behandlung mit $NaBH_4$ konnten spezifische Veränderungen in der Basenzusammensetzung einzelner tRNAs erzielt werden. Modifiziert wurden in $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Tyr}$ sämtliche hU-Reste. Diese Modifizierung wurde nicht durch unspezifische Nebenreaktionen begleitet. 2 - 10% einer Nebenreaktion wären nachweisbar gewesen.

In $tRNA^{Phe}$ wurden unter den Standardbedingungen neben der vollständigen Reduktion der beiden hU-Reste das bislang unbekannte Nucleosid Y zu etwa 70% umgewandelt. m^7G konnte nur in $tRNA^{Phe}$-Fragmenten, nicht jedoch in intakter $tRNA^{Phe}$ reduziert werden. Da das Reduktionsprodukt (m^7G^+) gegen Luftsauerstoff sehr empfindlich ist, konnte diese Reaktion zur Untersuchung der Rolle von m^7G für die biologischen Aktivitäten der $tRNA^{Phe}$ nicht ausgewertet werden. m^1A konnte auch nur in $tRNA^{Phe}$-Fragmenten und nicht in intakter $tRNA^{Phe}$ reduziert werden. Die Rolle von m^1A für die Erkennung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde in Gemischen der $tRNA^{Phe}$-Hälften untersucht.

Keine Veränderung der Akzeptoraktivität wurde für $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Tyr}$ und $tRNA^{Ala}$ nach der Behandlung mit $NaBH_4$ beobachtet. Die Akzeptoraktivitätsverluste, die gelegentlich bei $tRNA^{Val}$ nach der Reduktion auftraten, konnten nicht befriedigend gedeutet werden, da weder die $tRNA^{Val}$ noch die Synthetase-Präparation hoch angereichert waren. Einige Experimente deuten darauf hin, daß dieser Effekt wahrscheinlich durch Verunreinigungen, die bei der Reduktion entstehen, verursacht wurde. Die Akzeptoraktivität von Gemischen der $tRNA^{Phe}$-Hälften wurde nicht durch die Reduktion von m^1A in der CCA-Hälfte beeinflußt. Auch Veränderungen in der Anfangsgeschwindigkeit der Aminoacylierungs-Reaktion konnten bei $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Tyr}$ nicht beobachtet werden. Wenn tRNA ohne C-A-Ende mit $NaBH_4$ behandelt wurde, erreichte der Cytidin- und Adenosin-5'-Phosphat-Einbau dieselben Werte, wie mit nicht reduzierten Kontrollen. Kein Effekt der Reduktion konnte auf die Bindungskapazität von $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Phe}$, $tRNA^{Val}$ und $tRNA^{Tyr}$ in der Polynucleotid- bzw. Triplett-stimulierten Ribosomenbindung festgestellt werden. Ferner war auch der Transfer von Serin in einem rohen Proteinsynthese-System nicht durch die $NaBH_4$-Reduktion bedeutend beeinflußt.

Einige der Beobachtungen sind im Einklang mit Befunden, die andere Arbeitsgruppen inzwischen veröffentlicht haben. So fanden Molinaro und Mitarbeiter (53) keinen Einfluß der Reduktion mit $NaBH_4$ auf die Akzeptoraktivität von $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Ala}$ und $tRNA^{Val}$.

Sie fanden auch keinen Effekt auf die poly(U,C)-stimulierte Ribosomen-Bindung von $tRNA^{Ser}$. Cerutti's Befund, daß die Akzeptoraktivität von $tRNA^{Val}$ durch die Reduktion vermindert wird (75), konnte gelegentlich auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden; es konnte aber gleichzeitig gezeigt werden, daß dieser Effekt durch eine Verunreinigung, die bei der Reduktion entsteht, hervorgerufen wird. Cerutti's Befunde über einen verminderten Adenosin-5'-Phosphat-Einbau in tRNA ohne dem 3'-terminalen A nach Behandlung mit $NaBH_4$ (75) konnten nicht bestätigt werden. Wenn die Reaktion unter günstigeren Bedingungen als in den Versuchen von Cerutti durchgeführt wurde, wurde auch mit reduzierter tRNA-C vollständiger Cytidin- und Adenosin-5'-Phosphat-Einbau erreicht.

Die Befunde der chemischen Modifizierung von tRNA müssen, wenn es um die Frage von spezifischen Erkennungsstellen geht, sehr vorsichtig gedeutet werden. Es kann nur selten ausgeschlossen werden, daß eine Konformationsänderung der tRNA als Folge der Modifizierung verursacht wurde. In Fällen, wo eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur nicht ausgeschlossen werden kann, kann ein etwaiger Verlust einer biologischen Aktivität der tRNA nicht eindeutig interpretiert werden. Durch die Reduktion von Y wurde die Ribosomen-Bindung von $tRNA^{Phe}$ nicht beeinflußt (siehe oben). Deswegen ist Y nicht ein wesentlicher Bestandteil der Erkennungsregion der $tRNA^{Phe}$ für das Ribosom. Wenn dagegen Y aus der tRNA-Kette durch milde Säurebehandlung herausgespalten wurde (34), ging die Bindungskapazität von $tRNA^{Phe}$ verloren. Dieser Verlust muß auf eine Konformationsänderung des Anticodons zurückgeführt werden, denn Y ist nicht ein wesentlicher Bestandteil der Ribosomen-Erkennungsregion der $tRNA^{Phe}$. Allein durch die Ergebnisse der Modifizierung mit Säure (34) wäre dieser Schluß nicht möglich gewesen.

Die chemische Modifizierung der hU-Reste hatte keinen Einfluß auf die Akzeptoraktivität von mindestens fünf tRNAs. Dies bedeutet, daß die hU-Reste nicht wesentliche Bestandteile der Erkennungsregion für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind. Es kann auch geschlossen werden, daß durch die Reduktion der hU-

Reste die dreidimensionale Struktur der tRNA nicht wesentlich verändert wurde, denn eine Veränderung hätte sicher einen Einfluß auf die Akzeptoraktivität der tRNA gehabt. Man kann jedoch an Hand der vorliegenden Daten nicht ausschließen, daß die Erkennungsstelle für die Synthetasen in der "hU-Schleife" oder der "S-Region" lokalisiert ist. Sicher ist nur, daß die ganze "hU-Schleife" bzw. "S-Region" für die spezifische Enzymerkennung nicht nötig ist.

Es wäre sehr interessant festzustellen, ob eine begrenzte Veränderung der Konformation der "hU-Schleife" einen Einfluß auf die Akzeptoraktivität der tRNA hätte. Diese Frage könnte experimentell untersucht werden. Es wurde nämlich gelegentlich beobachtet, daß die Stabilität der N-Glycosidischen Bindung von hU^+ stark herabgesetzt ist (die Daten sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt). Herrn Thiebe in unserem Laboratorium ist es gelungen, hU^+ durch milde Säurebehandlung aus der $tRNA^{Phe}$ herauszuspalten. Voraussichtlich dürfte diese Modifizierung eine begrenzte Konformationsänderung der"hU-Schleife"herbeiführen. Hätte auch diese Modifizierung keinen Einfluß auf die Akzeptoraktivität der tRNA, so könnte mit ziemlicher Sicherheit gesagt werden, daß der überwiegende Teil der "hU-Schleife" nicht essentiell für eine spezifische Wechselwirkung mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase ist.

Man kann alle erhältlichen Daten aus der Literatur sammeln, wo bei einer chemischen oder enzymatischen Modifizierung einer tRNA trotz Veränderungen in der Basensequenz die Akzeptoraktivität der tRNA erhalten blieb. Solche Daten sind interessant, denn sie können eindeutig interpretiert werden: Die betroffenen Reste der tRNA sind nicht essentielle Bestandteile der spezifischen Erkennungsregion für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Die Daten könnten zu einem "Negativkatalog" zusammengestellt werden (76). Nach Vervollständigung dieses "Negativkatalogs" wäre dann die Enzymerkennungsstelle stark "eingekreist". In einem solchen "Negativkatalog", der bereits die nahezu vollständige "Anticodonregion" enthält (26-28, 32-35, 62, 77) sowie Teile der "hU-Region"

(28, 66, 78), Teile der "S-Region" (51, 53), tU (29), m_2^2G (79), Teile des "Akzeptor-Stammes" (80), Teile des "Anticodon-Stammes" (80) und Teile der "T-Ψ-C-Region" (81), können ferner an Hand der Daten aus der vorliegenden Arbeit hU, Y und m^1A eingetragen werden.

4. Beschreibung der Versuche

4.1 Materialien

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe wurde von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH. bezogen. Fraktionierte tRNAs wurden in unserem Laboratorium dargestellt: $tRNA^{SerI+II}$ von Frl. S. Notz und Herrn J. Kruppa, $tRNA^{Phe}$ von Herrn R. Thiebe und Frl. S. Notz, $tRNA^{Phe}$(HCl) von Herrn K. Harbers. Ein teilweise angereichertes $tRNA^{Val}$-Präparat wurde freundlicherweise von Herrn H. Feldmann zur Verfügung gestellt. $tRNA^{Tyr}$ wurde durch Abwandlung einer bekannten Methode (83) dargestellt (siehe Methoden).

tRNA Fragmente (35, 84) wurden von Herrn W. Wintermeyer und Herrn P. Philippsen (64) überlassen. Oligonucleotide, wie m^7G-U-C-m^5C-U-Gp und m^1A-U-C-C-A-C-A-Gp, konnten nach vollständiger Hydrolyse von $tRNA^{Phe}$ mit T1-RNase und chromatographischer Auftrennung der Oligonucleotide (58, siehe Abb. 6, 7 u. 11) erhalten werden. tRNA-C (tRNA, der das 3'-terminale pC und pA entfernt wurde) wurde durch limitierten Abbau mit Schlangengift-PDE dargestellt (74)

Das rohe Gemisch der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (EC 6.1.1) aus Brauereihefe wurde nach einem in unserem Laboratorium ausgearbeiteten Verfahren hergestellt (34). Das Gemisch enthielt auch die CCA-Pyrophosphorylase (tRNA-Cytidilyl-Adenylyl-Transferase). 200- bis 300-fach angereicherte Seryl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase-Präparate wurden freundlicherweise von Herrn R. Hirsch bzw. Frau D. Ponzi zur Verfügung gestellt. T1-Ribonuclease (EC 3.1.4.8) war ein Produkt der Fa. Sankyo u. Co., Tokio, mit 5000 Enzym-Einheiten/mg Protein (86). Pankreas-Ribonuclease

(EC 2.7.7.16) wurde von Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., bezogen. Alkalische Phosphatase aus E. coli (EC 3.1.3.1) (Phosphomonoesterase) wurde von Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., bezogen und nach einer bekannten Vorschift (97) gereinigt. Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) wurde aus Schlangengift von Crotalus adamanteus (R. Allen's Reptile Institute, Silver Spring, Fla.) von Herrn H. Feldmann mit folgenden Reinigungsschritten dargestellt:

1. Drei Acetonfällungen nach Björk (88).
2. Zwei Alkoholfällungen nach Felix et al. (89), die jedoch bei pH 8.9 vorgenommen wurden.
3. Chromatographie an CM-Cellulose nach Felix et al. (89) und Melchers et al. (90).
4. Konzentration der Lösung nach (90).

Proben wurden nach Zugabe von 5% Glykol bei -20° aufbewahrt. Sie enthielten 3200 R.E.(91)/ml.

DEAE-Cellulose (0.6-1.2 mäq/g) wurde von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen. Vorbereitung: Siehe Methoden. Sephadex G-25 und G-100 für die Gelfiltration waren ein Produkt der Fa. Pharmacia, Uppsala. Vorbereitung: Siehe Methoden. Kationen-Austauscherharz AG 50W-X8 von Bio Rad wurde von der Fa. Calbiochem, Los Angeles, bezogen. Vorbereitung: Siehe Methoden. BD-Cellulose wurde in unserem Laboratorium von Herrn J. Kruppa dargestellt (85).

Für die Papierchromatographie und Papierelektrophorese wurde Papier 2043b Mgl. der Fa. Schleicher u. Schüll, Einbeck, benutzt. Zur Dünnschichtchromatographie wurden Cellulose-Platten oder Cellulose-Platten mit Fluoreszenzindikator der Fa. E. Merck, Darmstadt, verwendet.

Zum Abfiltrieren von gefällter tRNA wurden Glasfaserfilter GF/C der Fa. Whatman und Membranfilter MF 50 der Membranfilter-Ges., Göttingen, benutzt. Membranfilter zur Druckdialyse, UM 2, waren ein Produkt der Fa. Amicon, Den Haag. Dialysierschläuche wurden von der Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen.

Reagentien waren, wenn nicht anders angedeutet, von der Fa. E. Merck, Darmstadt, Reinheitsgrad "p.A.". Harnstoff (E. Merck, Darmstadt, "chemisch rein") wurde in einigen Experimenten nach dem Auflösen in Wasser über Membranfilter MF 50 filtriert. Cacodylsäure (Fp. 198-202°, The British Drug Houses Ltd., England) wurde aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. L-Tyrosin, "A-grade", wurde von California Corp. for Biochemical Research, Los Angeles 63, bezogen. ATP war ein Produkt der Fa. Zellstoff Waldhof. Lösungsmittel: Toluol und Dioxan wurden vor Gebrauch absolutiert und destilliert, Äthanol war mit Methyl-äthyl-keton vergällt.

Radioaktive Reagentien: ^{14}C-Aminosäuren und ^{3}H-Aminosäuren wurden von New England Nuclear Corp., Boston, Mass., oder von der Fa. Radiochemical Centre, Amersham, erhalten. ^{3}H-CTP (Tetra-Ammoniumsalz in 50% Äthanol) war ein Produkt der Fa. Schwartz Bioresearch, Orangeburg, Pa. $NaBT_4$ (200 C/M) wurde von New England Nuclear Corp., Boston, Mass., bezogen. Toluol-Szintillator enthielt 4 g Omnifluor (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) auf 1 l über Natrium destilliertes Toluol. Bray-Szintillator (96) enthielt in einem Liter 60 g Naphthalin, 4 g Omnifluor, 100 ml Methanol (abs.), 20 g Glycol (dest.) und Dioxan.

4.2 Apparative Hilfsmittel

Zur Messung der UV-Absorption wurde entweder ein Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, oder ein registrierendes Spektralphotometer, Cary Modell 15, Varian Ass., benutzt. Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Packard Instrument Inc., La Grange, Ill., Tricarb-Modell 3310 oder 3375) vorgenommen. Die Radioaktivität auf Chromatogrammen oder Papierelektropherogrammen wurde mit einem Dünnschicht-Scanner II, Berthold LB 2722, der Fa. Berthold bestimmt. Zur Konstanthaltung des pH-Wertes bei Nuclease-Spaltungen wurde ein Autotitrator der Fa. Radiometer, Kopenhagen, benutzt. Das Gerät zur Druckdialyse stammte von Amicon, Den Haag.

4.3 Methoden

4.3.1 Vorbereitung von Ionenaustauschern

DEAE-Cellulose wurde nach kurzem Quellen in Wasser 10 Min in 0.5 M Natronlauge gerührt und anschließend mit Wasser neutral gewaschen. Die weitere Behandlung war jeweils dem Verwendungszweck angepaßt:

(a) Zur Fraktionierung der Valin-spezifischen tRNAs (72) wurde die DEAE-Cellulose in eine 1 M NaCl-Lösung eingerührt und auf pH 7.0 eingestellt. Anschließend wurde mehrere Male in Wasser aufgeschlämmt, abgesaugt, in dem gewünschten Puffer aufgenommen und in der Säule äquilibriert.

(b) Zur Chromatographie der Oligonucleotide von $tRNA^{Ser}$ nach Spaltung mit T1-RNase/PME (55) wurde die neutralgewaschene DEAE-Cellulose in 1 M Ammoncarbonat aufgenommen, mit CO_2 auf pH 8.6 eingestellt, abgesaugt und schließlich mit 0.01 M Ammoncarbonat, pH 8.6, äquilibriert.

(c) Für die Säulen (0.3 x 100 cm) zur Auftrennung von geringen Mengen an Oligonucleotid-Material (5-30 A_{260}-Einheiten) mußte die DEAE-Cellulose besonders sorgfältig vorbereitet werden, um angemessene Durchflußgeschwindigkeiten bei der Chromatographie zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde die neutralgewaschene DEAE-Cellulose mit einer 1 M NaCl-Lösung äquilibriert, abgesaugt, fünfmal in Puffer (entweder: 0.01 M NaCl, 0.05 M Tris/HCl, pH 7.5, 7 M Harnstoff, oder: 0.01 M NaCl, 0.05 M Tris/Acetat, pH 5.5, 7 M Harnstoff) aufgenommen, abgesaugt und zuletzt in diesem Puffer zwei- bis dreimal geschlämmt. Zur Aufbewahrung wurde die vorbereitete DEAE-Cellulose trockengesaugt und in angemessenen Anteilen eingefroren. Öfteres Tauen und Einfrieren wurde vermieden.

Gebrauchte und/oder länger gelagerte BD-Cellulose wurde vor Gebrauch mit 1.5 M NaCl, 1.5 M NaCl + 20% Äthanol, 96% Äthanol und schließlich mit Puffer (10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, 0.4 M NaCl) gewaschen.

Sephadex G-100 wurde nach dem Quellen 3 Stunden mit 0.05 M Phosphatpuffer, pH 6.8, gekocht (92°, abgesaugt und mit dem gewünschten Puffer äquilibriert.

AG 50W-X8 Kationen-Austauscherharz wurde nach kurzem Quellen in Wasser zweimal mit 1 M NaOH, dann neutral gewaschen, anschließend zweimal mit 1 M HCl und wieder neutral gewaschen. Das Harz wurde wenige Stunden danach gebraucht. Nach längerer Lagerung (ca. 2 Tage) wurde die Waschprozedur wiederholt.

4.3.2 Anreicherung von $tRNA^{Tyr}$

Die Methode von Maxwell und Mitarbeitern (83) zur Isolierung von 1-2 mg $tRNA^{Tyr}$ wurde im hundertfachen Maßstab durchgeführt. Etwa 300 mg tRNA (eine Fraktion von einer BD-Cellulose-Säule, spez. Akt. 400 pMole Tyr/A_{260}-Einheit) wurden enzymatisch mit L-Tyrosin beladen. Das Inkubationsgemisch enthielt neben der tRNA in 1000 ml: 0.1 Mol Cacodylsäure mit NaOH auf pH 7.6 eingestellt, 20 mMole $MgCl_2$, 20 mMole KCl, 1 mMol EDTA (Dinatrium-Salz), 0.5 mMole ATP, 10 mMole Mercaptoäthanol, 0.5 mMole L-Tyrosin und 0.5 mC ^{3}H-L-Tyrosin. Die Lösung wurde auf 25° erwärmt und mit 100 ml eines rohen Gemisches der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (30 A_{280}-Einheiten/ml) versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 25 Min bei 25° wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 ml einer 1 M Natriumacetat-Lösung, pH 5.0, beendet. Die Proteine wurden mit 1500 ml wassergesättigtem Phenol extrahiert und die wäßrige Phase mit 200 ml einer 5 M NaCl-Lösung versetzt. Die erneut gebildete geringe Phenolphase wurde verworfen und die wäßrige Phase mit 2000 ml kaltem Äthanol gefällt. Die Suspension wurde zur vollständigen Fällung der Nucleinsäure einige Stunden bei -20° aufbewahrt, der abzentrifugierte Niederschlag schließlich zweimal aus 100 ml eiskaltem Puffer (10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0) mit dem 2.5-fachen Volumen an Äthanol umgefällt. Zuletzt wurde die tRNA in 100 ml eiskaltem Puffer (10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, 0.4 M NaCl) aufgelöst und bei 4° auf eine BD-Cellulose-Säule, die mit demselben Puffer äquilibriert war, aufgetragen.

Die reine $tRNA^{Tyr}$ wurde durch folgende Reinigungsschritte gewonnen:

(A) Chromatographie von Tyr-$tRNA^{Tyr}$: BD-Cellulose-Säule 4 x 100 cm; eluiert bei 4° mit einem linearen NaCl-Gradienten: 2 x 2 l 0.4 - 0.9 M, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0; dann mit 2 l 1.0 m NaCl im selben Puffer, zuletzt mit einem linearen Äthanol-Gradienten: 2 x 2 l 0-10%, 1.0 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 (siehe Abb. 23A).

Fraktionen mit konstanter spezifischen Radioaktivität (in Abb. 23A mit Pfeilen markiert) wurden gesammelt, durch Druckdialyse eingeengt, mit Äthanol gefällt und der abzentrifugierte Niederschlag kurz über $CaCl_2$ getrocknet. Die Abspaltung des Tyrosins von der Tyr-$tRNA^{Tyr}$ wurde durch eine einstündige Inkubation in 1.8 M Tris/Acetat, pH 8.0, bei 37° erreicht. Diesem Schritt folgte wieder eine Äthanolfällung.

(B) Chromatographie von $tRNA^{Tyr}$: Die Chromatographie erfolgte an einer BD-Cellulose-Säule 2 x 50 cm; eluiert wurde bei 4° mit einem linearen NaCl-Gradienten: 2.3 l von 2 x 1.5 l 0.4 - 1.0 M, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Natriumacetat, pH 5.0; dann mit 700 ml 1.1 M $NaCl_2$ im selben Puffer; anschließend wurde dem Puffer 9.5% Äthanol zugesetzt (siehe Abb. 23B).

Die Fraktionen mit konstanter Tyrosin-Akzeptoraktivität wurden durch Druckdialyse eingeengt und mit Äthanol gefällt. Der

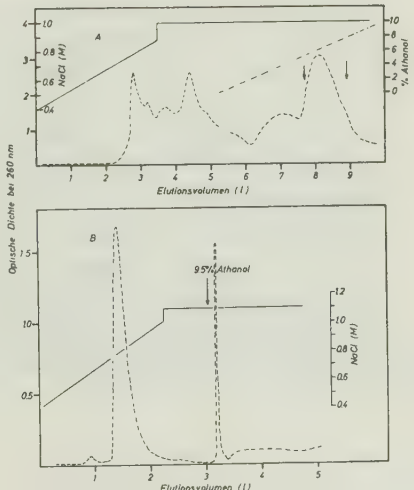


Abbildung 23: Anreicherung von $tRNA^{Tyr}$. (A) Chromatographie von Tyr-$tRNA^{Tyr}$ an BD-Cellulose. (B) Chromatographie von $tRNA^{Tyr}$ an BD-Cellulose. ---, Optische Dichte bei 260 nm; ——, NaCl; -.-., Äthanol.

äthanolfeuchte Niederschlag wurde bei -20° aufbewahrt. Die Ausbeute (1350 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Tyr}$ mit der spezifischen Aktivität von 1370 pMole Tyr/A_{260}-Einheit) betrug etwa 60% auf die Akzeptoraktivität bezogen. Die Reinheit der tRNA läßt sich aus der Oligonucleotidanalyse nach Spaltung mit T1-RNase (Abb. 6) zu etwa 95%ig abschätzen.

4.3.3 Reduktion von tRNA mit Natriumborhydrid

Ein typischer Ansatz enthielt in einem ml: 50 - 100 A_{260}-Einheiten tRNA oder entsprechende Mengen (etwa 0.2 µMole) Oligonucleotide, 0.2 mMole KCl, 0.01 mMol $MgCl_2$, 0.2 mMole Natriumborat-Puffer, pH 9.8 und 0.1 - 0.2 mMole Natriumborhydrid. Im allgemeinen wurde die wäßrige tRNA-Lösung dem Reduktionsansatz zuletzt zugeführt. Kontrollen wurden wie die zu reduzierende tRNA behandelt, die Inkubationslösung enthielt jedoch kein Natriumborhydrid. In einigen Versuchen enthielten die Ansätze für die Kontrollen "zerstörtes Borhydrid": $NaBH_4$ mit Essigsäure angesäuert, kurz auf 100° erhitzt und nach dem Abkühlen der Lösung mit NaOH auf pH 9.8 eingestellt. Die Reduktion wurde, wenn nicht anders angegeben, 3 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt und durch Zugabe von etwa 1 ml 1 M Essigsäure beendet. (Vorsicht bei Verwendung von $NaBT_4$: Tritium-Entwicklung!).

In einigen Experimenten (2.2) wurden zur Eichung der spezifischen Radioaktivität des $NaBT_4$ Eichsubstanzen reduziert (Östron, Dihydrouridin). Die Reduktion von Dihydrouridin wurde, wie für tRNA und für Fragmente beschrieben, vorgenommen. Die Reduktion des Östrons wurde in 50% Methanol (wegen der geringen Löslichkeit des Östrons in Wasser) 1 Stunde bei 70° durchgeführt. Nach der Zugabe von Essigsäure wurden die Lösungen im Exsiccator zur Trockne eingedampft, in 0.5 ml Wasser aufgenommen und wieder eingedampft. Die Rückstände wurden in 0.2 ml Wasser aufgenommen und in 5 ml Bray-Szintillator gezählt. Abbildung 24 zeigt, daß die gemessene Radioaktivität linear proportional der eingesetzten Menge Östron bzw. hU ist. Die Steigung der Geraden gibt die spezifische Radioaktivität an.

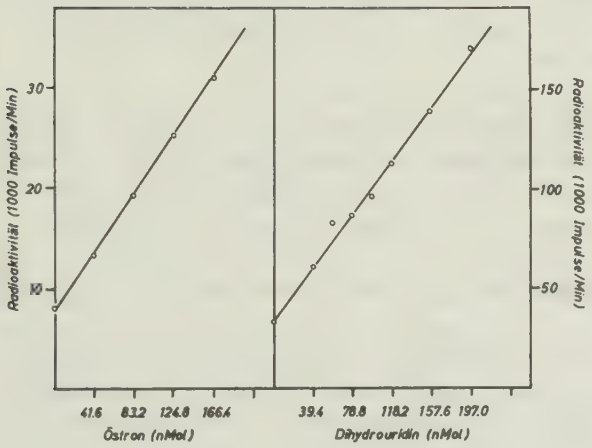


Abbildung 24: Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von $NaBT_4$. Die Steigung der Geraden gibt die korrigierte spezifische Radioaktivität des Reduktionsmittels $NaBT_4$ an.

4.3.4 Reinigung von tRNA und von Fragmenten nach Behandlung mit Natriumborhydrid

Die essigsauren Lösungen wurden 5 - 10 Min stehengelassen (nach Reduktion mit $NaBT_4$ in einem gut ziehenden Abzug!), dann nach einer der Methoden gereinigt:

(a) Die saure Lösung wurde mit dem dreifacher Volumen an Äthanol gefällt und anschließend dreimal mit Äthanol aus einer 2-5% Kaliumacetat-Lösung, pH 6, umgefällt. Nach jeder Fällung wurde die Suspension einige Stunden bei -20° aufbewahrt.

(b) Die saure Lösung wurde mit Wasser auf das fünffache Volumen verdünnt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Die reduzierte Substanz wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von der Säule eluiert: 0.1 -

1.5 M, 0.05 M Natriumacetat, pH 5.5. Reduzierte tRNA und lange Fragmente wurden dialysiert, eingeengt und mit Äthanol gefällt oder gefriergetrocknet, kurze Oligonucleotide nach (4.3.6.3) isoliert.

Die nach (a) oder (b) gereinigte, mit $NaBT_4$ reduzierte tRNA enthielt gelegentlich noch austauschbare Radioaktivität. Diese konnte durch Chromatographie in 7 M Harnstoff und/oder durch längere Dialyse gegen destilliertes Wasser entfernt werden.

4.3.5 Spektrophotometrische Verfolgung der Reduktion von m^7G

7 - 14 A_{260}-Einheiten $tRNA^{Phe}$, 3 - 4 A_{260}-Einheiten CCA-Hälfte von $tRNA^{Phe}$, 0.4 - 1.2 A_{260}-Einheiten m^7G-U-C-m^5C-U-Gp oder 0.15 - 0.2 A_{260}-Einheiten m^7G wurden in einem Gesamtvolumen von 60 µl entweder bei Raumtemperatur oder bei 80° reduziert. Die Reduktionszeiten sind aus den Bildunterschriften der Abb. 15 zu entnehmen. Überschüssiges $NaBH_4$ wurde durch Zugabe von 30 µl 1 M Essigsäure zerstört. Die Lösung wurde sofort in eine 1 ml Quarzküvette zu Phosphatpuffer (0.15 M Natriumphosphat, pH 7.0, 2 mM $MgCl_2$) pipettiert. Durch Schütteln wurde die Lösung mit Luftsauerstoff gesättigt und die Abnahme der Absorption bei 310 nm als Funktion der Zeit verfolgt. Als Endpunkt wurde der Wert genommen, der sich eine halbe Stunde nicht mehr verändert hat. Dieser Wert wurde zur Bestimmung der A_{310}-Werte verwendet.

4.3.6 Oligonucleotid-Analyse

4.3.6.1 Enzymatische Spaltung von tRNA und Fragmenten

100 A_{260}-Einheiten oder mehr tRNA bzw. Fragmente wurden mit T1-RNase nach der Vorschrift in Ref. (55) gespalten. Weniger als 100 A_{260}-Einheiten tRNA oder Fragmente wurden einheitlich in 1 ml mit 250 Enzymeinheiten (86) hydrolysiert. Die Lösung wurde bei pH 7.5, 45°, konstant gehalten (siehe 4.2), die Aufnahme von Lauge (0.01 M NaOH) automatisch registriert. Die Inkubation wurde eine halbe Stunde nach Beendigung der Aufnahme

der Lauge beendet. Das Oligonucleotidmaterial wurde direkt oder nach Zugabe von Harnstoff (ad 7 M, pH 7.5 bzw. 5.5) auf Chromatographiesäulen aufgetragen.

Die Spaltung geringer Mengen (bis 2 A_{260}-Einheiten) an Oligonucleotidmaterial wurde wie folgt durchgeführt: Auf einem Streifen "Parafilm" wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert: 10 µl Puffer (0.1 M Triäthylammoniumcarbonat, pH 7.8, 1 mM $MgCl_2$), 5 µl Pankreas-RNase (1 mg/ml), 0.2 - 2 A_{260}-Einheiten Oligonucleotide und Wasser ad 75 µl. Der Tropfen wurde in eine 100 µl Glaskapillare überführt, eingeschmolzen und 4 Stunden bei 37° inkubiert. Die Lösung wurde anschließend in einem kleinen Zentrifugenröhrchen aus Polyäthylen zur Trockne eingeengt, in 5 - 10 µl Wasser aufgenommen und zur weiteren Analyse verwendet. Spaltungen mit PDE oder mit PDE/PME wurden in derselben Weise durchgeführt. 75 µl enthielten 3 - 5 Razzel-Einheiten (91) PDE und 5 µl PME (1 mg Prot./ml).

4.3.6.2 Säulenchromatographie von Oligonucleotiden

Die Oligonucleotide von $tRNA^{Ser}$ nach T1-RNase/PME-Spaltung wurden nach Zachau, Dütting und Feldmann (55) chromatographiert. Größere Oligonucleotidmengen (100 - 200 A_{260}-Einheiten) aus T1-RNase-Spaltungen von $tRNA^{Phe}$ wurden nach RajBhandary und Mitarbeitern (58) aufgetrennt. Geringe Mengen der Oligonucleotide wurden auf 0.3 x 100 cm DEAE-Cellulose-Säulen fraktioniert. Die DEAE-Cellulose in 0.01 M Tris/HCl, pH 7.5 (oder 0.01 M Tris/Acetat, pH 5.5), 0.01 M NaCl, 7 M Harnstoff, wurde unter einem Druck von 1 - 1.5 Atü sedimentiert und bei etwa 2 Atü äquilibriert. Es war wichtig, beim Äquilibrieren den Raum zwischen der Cellulose und der Pumpe vollständig mit Puffer zu füllen. Wurde dies nicht beachtet, dann löste sich bei dem hohen Druck die Luft im Puffer auf und wurde später in der Säule an Stellen von niedrigerem Druck unter Blasenbildung freigesetzt. Die Flußgeschwindigkeit der Säulen betrug 3 - 10 ml/Stunde. Vor dem Auftragen der Oligonucleotide wurden die Säulen mit 100 - 200 ml Puffer vorgewaschen. Die Substanzen wurden in 7 M Harnstoff auf die Säule "aufgezogen"; der Druck in der Säule wurde auch nicht für kurze Zeit gesenkt.

4.3.6.3 Isolierung der Oligonucleotide aus Säuleneluaten

Größere Oligonucleotid-Mengen können nach bekannten Vorschriften isoliert werden (55, 58, 93). Zur Isolierung geringer Nucleotid-Mengen aus Harnstoff- und Salzlösungen wurden die Oligonucleotide mit Zn^{2+} ausgefällt. Eine bekannte Vorschrift (94) wurde modifiziert. Es wurde wie folgt verfahren: Zum Ausfällen der Oligonucleotide wurde 1 ml des Säuleneluates mit 20 µl 1.1 M Zinkacetat-Lösung versetzt und mit 1 M NaOH auf pH 8.1 eingestellt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und auf 8.1 nachgestellt, nachdem die gallertige Masse 10 Min bei Raumtemperatur magnetisch gerührt wurde. Schließlich wurde der Niederschlag abzentrifugiert und dreimal mit dem 1.5-fachen Volumen einer 2 mM $NaHCO_3$-Lösung, pH 8.1, gewaschen, um Reste von Harnstoff zu entfernen. Der pH-Wert mußte ständig kontrolliert und korrigiert werden. Aufgelöst wurde der Niederschlag mit 1 M Ammoniumcarbonat, pH 8.5. Hierzu wurde die 10-fache Menge der verwendeten Zinkacetat-Lösung benötigt. Nachdem man 2 Min gerührt hat, war die Lösung erfahrungsgemäß noch nicht vollkommen klar. Einige Tropfen konz. Ammoniak (pH 8.5 sollte jedoch nicht überschritten werden) reichten zur Klärung der Lösung meist aus. Wenn nicht, dann wurde noch etwas 1 M Ammoncarbonat zugegeben. Die Entfernung der Salze aus der Lösung erfolgte mit Hilfe eines Kationen-Austauschers. Aus einer frisch vorbereiteten (4.3.1) AG 50W-X8-Suspension wurde so viel Austauscher-Harz zugegeben (CO_2-Entwicklung), bis pH 5 - 5.2 erreicht war (zwischen pH 7.5 und 6.5 trat vorübergehend eine Fällung ein, die jedoch nicht störte). Unter gelegentlichem Umrühren wurde die Suspension 10 - 15 Min lang stehengelassen, wobei der pH-Wert auf 3.8 - 4.1 sank. Die Suspension wurde nun vom Harz abfiltriert und die Oligonucleotidlösung eingeengt.

4.3.6.4 Papierelektrophorese und Chromatographie

Papierelektrophoresen wurden bei pH 2.7 bzw. 3.5 durchgeführt. Die Puffer enthielten: 25 ml konz. Ameisensäure, 5 ml 0.1 M EDTA, 3 l Wasser, mit Ammoniak auf pH 2.7 eingestellt, bzw. 15 ml konz. Ameisensäure, 8 ml 0.1 M EDTA, 5 l Wasser, mit

Ammoniak auf pH 3.5 eingestellt. Papier- und Dünnschichtchromatographie wurde in folgenden Systemen durchgeführt:

A: Essigsäureäthylester-nPropanol-Wasser (4:1:2, V/V/V, Oberphase)
B: Butanol mit Wasser gesättigt.

4.3.7 Biologische in vitro Tests

4.3.7.1 Aminoacylierung von tRNA

Das Inkubationsgemisch enthielt in 0.1 ml: 0.01 - 1 A_{260}-Einheit tRNA, 0.2 A_{280}-Einheiten rohe Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Fraktion, 1 µMol ATP, 1.5 µMole $MgCl_2$, 2.5 µMole Tris/HCl, pH 7.5, und 0.01 µMol D,L-^{14}C-Aminosäure. Das Gemisch wurde 15 Min bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde mit eiskalter 5%iger Trichloressigsäure beendet. Die ausgefallene Aminoacyl-tRNA wurde über Glasfaser-Filter oder Membranfilter abfiltriert, dreimal mit ca. 5 ml 5% Trichloressigsäure und zuletzt mit Äthanol (nicht bei Membranfiltern) gewaschen. Die Filter wurden 30 Min bei 80° getrocknet und in Toluol-Szintillator gezählt.

Präparative Ansätze enthielten bis 30 A_{260}-Einheiten tRNA pro ml, alles Übrige wie im analytischen Test. Nach der Inkubation wurden die Lösungen durch Extraktion mit Phenol von Protein befreit und mit Äthanol gefällt. Zur Abtrennung von ATP wurde die Aminoacyl-tRNA aufgelöst und gegen 0.01 M Natriumacetat, pH 5.0, dialysiert.

4.3.7.2 Ribosomen-Bindungstest

Zur Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosome wurde das System von Nirenberg und Leder (73) abgewandelt: Inkubationsgemische enthielten in 0.1 ml: 3.2 A_{260}-Einheiten Ribosome (gewaschen wie in (95)), 0.05 ml Puffer (0.2 M Tris-acetat, pH 7.2, 0.04 M Mg-acetat, 0.08 M KCl). Die Polynucleotid- bzw. UpApU-Menge ist aus der Abbildung 22 ersichtlich. Die Menge der zugesetzten

Aminoacyl-tRNAs ist in der Legende zu Abb. 22 beschrieben. Nach 20 Min Inkubation bei 23° wurden die Proben über Membranfilter abgesaugt, zweimal mit obigem Puffer (1:1 verdünnt) gewaschen, getrocknet und gezählt.

4.3.7.3 Poly(U,C)-stimulierter Einbau von ^{14}C-Serin in Polypeptid

Die Inkubationsgemische enthielten in 0.1 ml: 4.2 A_{260}-Einheiten Ribosome, 0.5 A_{280}-Einheiten dialysierten S100-Überstand von E. coli, 0.15 nMol (^{14}C)Ser-tRNA^{Ser}, 3.0 A_{260}-Einheiten tRNA, 0.05 µMol L-Aminosäure (19 ohne Ser), 0.03 µMol GTP, 0.1 µMol ATP, 0.2 µMol Phosphoenolpyruvat, 2 µg Pyruvat-Kinase, 0.7 µMol 2-Mercaptoäthanol, 1.6µMol Magnesiumacetat, 0.8 µMol KCl, 0.8 µMol Tris/HCl, pH 7.8, 1.0 A_{260}-Einheit Poly(U_1C_1). Das Gemisch wurde verschieden lange bei 37° inkubiert. Dann wurde mit 1 ml 10% Trichloressigsäure gefällt, 20 Min auf 90° erhitzt, der Niederschlag dreimal mit 5% Trichloressigsäure gewaschen, schließlich in 1.0 ml 1/30 M NaOH gelöst und in 10 ml Bray-Szintillator gezählt.

4.3.7.4 Einbau von pC und pA in die 3'-terminale Position von tRNA

Gemessen wurde entweder der pC- bzw. pA-Einbau in tRNA-C oder der CTP-abhängige Aminosäure-Einbau in tRNA-C. Im ersten Fall enthielten die Inkubationsgemische in 0.1 ml: 0.11 A_{260}-Einheiten tRNA-C, 1 µl Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Fraktion (die auch die CCA-Pyrophosphorylase enthielt), 1 µMol ATP, 1.5 µMol $MgCl_2$, 2.5 µMol Tris/HCl, pH 8.3 und 0.01 µMol ^{3}H-CTP. Inkubiert wurde 15 Min bei 37°, dann wurde die tRNA mit 5% Trichloressigsäure gefällt, über Glasfiberfilter abfiltriert und die Filter gezählt. Für den CTP-abhängigen Aminosäure-Einbau in tRNA-C enthielten diese Inkubationslösungen in 0.1 ml: 0.5 A_{260}-Einheiten tRNA-C, 1 µl Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Fraktion, 1 µMol ATP, 1 µMol CTP, 1.5 µMol $MgCl_2$, 2.5 µMol Tris/HCl, pH 8.3 und 0.01 µMol radioaktive D,L-Aminosäure oder 0.005 µMol radioaktive L-Aminosäure.

Inkubiert wurde wir unter (4.3.7.1) beschrieben. Die tRNA wurde mit 5% Trichloressigsäure ausgefällt, abfiltriert (4.3.7.1) und in Toluol-Szintillator gezählt.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) gehören zu den kleinsten biologisch aktiven Nucleinsäuren der Zelle. Sie spielen eine wichtige Rolle im Zellgeschehen. Es gibt für jede der 20 natürlichen Aminosäuren mindestens eine spezifische tRNA, die die entsprechende Aminosäure kovalent bindet und auf die wachsende Peptidkette überträgt. Es ist wohl bekannt, daß beide Schritte, die kovalente Bindung der Aminosäure an die tRNA ("Akzeptor-Schritt") sowie die Übertragung der aktivierten Aminosäure auf die wachsende Peptidkette ("Ribosomen-Bindung" und "Transfer"), sehr spezifisch verlaufen. In den vergangenen Jahren wurden rasche Fortschritte auf dem Gebiet der tRNA-Forschung erzielt und interessante Zusammenhänge zwischen der Struktur der tRNA und ihrer Funktion (besonders der spezifischen Ribosomen-Bindung) aufgeklärt (siehe Einleitung und Ref. 11).

Die strukturellen Grundlagen, die den spezifischen Wechselwirkungen der tRNA mit Enzymen (Aminoacyl-tRNA-Synthetase, CCA-Pyrophosphorylase, Methylasen und andere modifizierende Enzyme) zugrunde liegen, sind heute noch nicht aufgeklärt. Es besteht die Hoffnung, daß am Beispiel der tRNAs grundsätzliche Fragen der Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkungen und damit grundlegende Probleme der Regulation und Zelldifferenzierung gelöst werden können. Deswegen werden Probleme der Struktur und Funktion der tRNA von vielen Arbeitsgruppen intensiv erforscht.

Die tRNAs unterscheiden sich von anderen Nucleinsäuren der Zelle erheblich; besonders auffällig ist das häufige Vorkommen minorer Nucleoside. Welche Rolle die minoren Nucleoside in der tRNA spielen, ist weitgehend unbekannt. Es war das Ziel dieser Arbeit, einige Beiträge zur Aufklärung der Rolle seltener Nucleoside für die Struktur und/oder Funktion der tRNAs zu liefern.

Untersucht wurden die mit $NaBH_4$ reduzierbaren seltenen Nucleoside (Schema 1). Die Reduzierbarkeit von m^7G und Y wurde im Verlauf dieser Arbeit entdeckt.

Folgende experimentelle Ergebnisse konnten erzielt werden.

1. Natriumborhydrid ist ein geeignetes Reagens zur spezifischen Modifizierung von tRNAs. Bei der Modifizierung mit $NaBH_4$ sind wichtige Voraussetzungen erfüllt: $NaBH_4$ ist ein mildes Reagens, das keine Kettenbrüche während der Behandlung der tRNA verursacht. Die hauptsächlichen Nucleoside und die meisten seltenen Nucleoside werden unter den Standardbedingungen nicht nennenswert angegriffen (Abb. 4, 6 und 8).
2. Unter den Standardbedingungen der Reduktion konnte die quantitative Umwandlung aller hU-Reste in drei tRNAs (Abb. 3, 4, 6 und 8) nachgewiesen werden. In $tRNA^{Phe}$ wird als weiteres Nucleosid Y reduziert (Abb. 8).
3. 4-Acetylcytidin (ac^4C), das als freies Nucleosid mit $NaBH_4$ rasch reagiert, wurde in $tRNA^{Ser}$ nicht angegriffen (Abb. 4 und 5). Dies bedeutet, daß ac^4C in der $tRNA^{Ser}$ in einer geschützten Position lokalisiert ist. Dieser Befund kann bei Betrachtung des Kleeblattmodells von $tRNA^{Ser}$ (Abb. 1A) auf eine einfache Weise erklärt werden. ac^4C ist in einem doppelsträngigen Bereich der $tRNA^{Ser}$ lokalisiert und ist durch Wasserstoffbrücken an ein G gebunden. Es ist in gutem Einklang mit Ergebnissen von Partialspaltungen mit Endonucleasen (61-66) und Modifizierungen mit anderen chemischen Reagentien (26-28, 30, 50, 51), daß Nucleoside in doppelsträngigen Bereichen der tRNA geschützt sind.
4. Es konnte gezeigt werden, daß 1-Methyladenosin (m^1A) in $tRNA^{Phe}$ von $NaBH_4$ nicht angegriffen wird (Abb. 9), wohl aber in Fragmenten von $tRNA^{Phe}$ (Abb. 10). Dieser Befund ist deswegen interessant, weil m^1A im Kleeblattmodell von $tRNA^{Phe}$ (Abb. 1A) in einem einsträngigen Bereich lokalisiert ist. Die Tatsache, daß m^1A in $tRNA^{Phe}$ dennoch gegen die Reduktion geschützt ist, läßt Rückschlüsse auf die dreidimensionale Struktur der $tRNA^{Phe}$ ziehen.

5. Der Schutz von m^1A gegen die Reduktion mit $NaBH_4$ wird von Teilen der pG-Hälfte der $tRNA^{Phe}$ bewirkt oder induziert, denn m^1A ist in der CCA-Hälfte von $tRNA^{Phe}$ in Abwesenheit der pG-Hälfte ungeschützt, in Gegenwart der pG-Hälfte jedoch geschützt (Tabelle 3).
6. Die reversible Reduktion von 7-Methylguanosin (m^7G) wurde in dieser Arbeit (unabhängig von einer anderen Arbeitsgruppe (48)) erstmals untersucht und photometrisch nachgewiesen (Abb. 12). Es entsteht ein Produkt (Schema 1), das sich bei Zutritt von Luftsauerstoff wieder in m^7G zurückverwandelt (Abb. 13).
7. m^7G, das als freies Nucleosid, als endständiges Glied eines Hexanucleotids oder als Teil der CCA-Hälfte von $tRNA^{Phe}$ rasch mit $NaBH_4$ reagiert, wird unter identischen Bedingungen in der intakten $tRNA^{Phe}$ nicht angegriffen (Abb. 15). Dieser Befund ist wiederum im Hinblick auf die dreidimensionale Struktur der $tRNA^{Phe}$ interessant, denn in dem zweidimensionalen Kleeblattmodell von $tRNA^{Phe}$ (Abb. 1A) ist m^7G (wie m^1A) in einem einsträngigen Bereich lokalisiert.
8. Es wurde untersucht, ob die seltenen Nucleoside hU und Y eine wesentliche Rolle in spezifischen Enzym-Erkennungsprozessen spielen. Ein Effekt der Reduktion auf die Akzeptoraktivität von 5 tRNAs konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 17). Verluste der Valin-Akzeptoraktivität konnten gelegentlich beobachtet (Abb. 17) und auf eine Hemmung der Valyl-tRNA-Synthetase durch Verunreinigungen zurückgeführt werden (Abb. 19). Auch die Anfangsgeschwindigkeit der Aminoacylierung wurde durch die Modifizierung mit $NaBH_4$ nicht beeinflußt (Abb. 21).
9. Ob m^1A in $tRNA^{Phe}$ eine wesentliche Rolle in der spezifischen Erkennung der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase spielt, konnte nur in Gemischen der pG-Hälfte und der reduzierten CCA-Hälfte untersucht werden (Abb. 20), da m^1A in der intakten $tRNA^{Phe}$ nicht reduziert wird. Die Reduktion von m^1A in der $tRNA^{Phe}$-Hälfte hatte keinen Einfluß auf die Akzeptoraktivität des Hälften-Gemisches.

10. Die Reduktion von hU und Y hat ferner keinen Einfluß auf die Ribosomen-Bindung der getesteten tRNAs (Abb. 22).
11. Durch die Behandlung mit $NaBH_4$ wurde auch die Transferaktivität von $tRNA^{Ser}$ nicht signifikant vermindert (Tabelle 5).
12. Der von der CCA-Pyrophosphorylase katalysierte Einbau von pC und pA in die 3'-terminalen Positionen von tRNA ohne C-A-Ende wurde durch die Reduktion nicht beeinflußt (Tabelle 6 und 7).

Über die wesentliche Rolle seltener Nucleoside in der tRNA liegen in der Literatur kaum experimentelle Daten vor. Aus Daten der Modifizierung von $tRNA^{Ala}$ mit Acrylnitril (27) geht hervor, daß das in der "T-Ψ-C"-Sequenz (die in allen tRNAs vorkommt) eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der nativen tRNA-Struktur spielt. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt man bei der Auswertung der experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit für Y, m^1A und m^7G. Y dürfte durch Ausübung von hydrophoben Kräften einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung der Anticodon-Konformation von $tRNA^{Phe}$ liefern. m^1A und m^7G, die beide unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung tragen, könnten durch Ausübung heteropolarer Kräfte einzelne Regionen der $tRNA^{Phe}$ stabilisieren (siehe 2.7).

Die Befunde, daß m^1A und m^7G in $tRNA^{Phe}$ geschützt sind, wurden im Zusammenhang mit mehreren hypothetischen dreidimensionalen tRNA-Modellen, die in der Literatur beschrieben sind, diskutiert. Die Modelle tragen dem Schutz von m^1A nur teilweise, dem Schutz von m^7G überhaupt nicht Rechnung. Sämtliche Modelle müssen daher revidiert werden.

Die experimentellen Befunde, daß die Reduktion keinen Einfluß auf die biologischen Aktivitäten der getesteten tRNAs hatte, wurde dahingehend gedeutet, daß die seltenen Nucleoside hU,

Y und m^1A nicht wesentliche Bestandteile der spezifischen Erkennungsregionen für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase sind. hU und Y sind auch nicht essentiell zur spezifischen Bindung der tRNA an das Ribosom und auch nicht wesentliche Bestandteile der Erkennungsregion für die CCA-Pyrophosphorylase. Ferner ist hU an der Erkennung der "Transfer-Enzyme" nicht essentiell beteiligt.

6. Literaturverzeichnis

(1) F.H.C. Crick, Cold Spring Harbor Symp. Quantitat. Biol. 31 (1966) ?.

(2) G.M. Beadle, Chem. Rev. 37 (1945) 15.

(3) J. Davies, W. Gilbert und L. Gorini, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51 (1964) 883.

(4) W. Szer und S. Ochoa, J. Mol. Biol. 8 (1964) 823.

(5) M.R. Capecchi und G.N. Gussin, Science, 149 (1965) 417.

(6) H.G. Khorana, H. Buchi, H. Ghosh, N. Gupta, T.M. Jacob, H. Kössel, R. Morgan, S.A. Narang, E. Ohtsuka und R.D. Wells, Cold Spring Harbor Symp. Quantitat. Biol. 31 (1966) 39.

(7) M. Nirenberg, T. Caskey, R. Marshall, R. Brimacombe, D. Kellog, B. Doctor, D. Hatfield, J. Levin, F. Rottman, S. Pestka, M. Wilcox, und F. Anderson, Cold Spring Harbor Symp. Quantitat. Biol. 31 (1966) 11.

(8) S. Ochoa, Naturw. Rundschau, 19 (1966) 483.

(9) F.H.C. Crick, J. Mol. Biol. 19 (1966) 548.

(10) H.M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner und J.D. Smith, Nature, 217 (1968) 1019.

(11) H.G. Zachau, Angew. Chem. 81 (1969) 645; Internat. Ed. 8 (1969) 711.

(12) K. Miura, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology, 6 (1967) 39.

(13) G.D. Novelli, Annu. Rev. Biochem. 36 (1967) 449.

(14) M. Yarus, Annu. Rev. Biochem. 38 (1969) 841.

(15) R.W. Chambers, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology, 11 (im Druck).

(16) R.B. Loftfield, L.I. Hecht und E.A. Eigner, Biochim. Biophys. Acta, 72 (1963) 383.

(17) T. Lindahl, A. Adams, M. Geroch und J.R. Fresco, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 178.

(18) T. Ishida und N. Sueoka, J. Biol. Chem. 243 (1968) 5329.

(19) J.T. Penniston, M. Steward und M.D. Tucker, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 358.

(20) R. Adman und P. Doty, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27 (1967) 579.

(21) J.A. Carbon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 1.

(22) J.A. Carbon, Biochim. Biophys. Acta, 95 (1965) 550.

(23) J.H. Weil, N. Befort, B. Rether und J.P. Ebel, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 447.

(24) A. Muto, K.I. Miura, H. Hayatsu und T. Ukita, Biochim. Biophys. Acta, 95 (1965) 669.

(25) M. Saneyoshi und S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta, 145 (1967) 208.

(26) F. Cramer, H. Doepner, F. v.d. Haar, E. Schlimme und H. Seidel, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61 (1968) 1384.

(27) M. Yoshida und T. Ukita, Biochim. Biophys. Acta, 157 (1968) 466.

(28) M. Litt, Biochemistry, 8 (1969) 3249.

(29) M. Yaniv, A. Favre und B.G. Barrell, Nature, 223 (1969) 1331.

(30) T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 10 (1969) 549.

(31) L.H. Schulman und R.W. Chambers, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61 (1968) 308.

(32) F. Fittler und R.H. Hall, Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 (1966) 441.

(33) R. Hirsch und H.G. Zachau, Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 563.

(34) R. Thiebe und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 5 (1968) 546.

(35) P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer und H.G. Zachau, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 922.

(36) F. Sanger, G.G. Brownlee und B.G. Barrell, J. Mol. Biol. 13 (1965) 373.

(37) J.T. Madison und R.W. Holley, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18 (1965) 153.

(38) B.S. Dudock, G. Katz, E.K. Taylor und R.W. Holley, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62 (1969) 941.

(39) M. Staehelin, H. Rogg, B.C. Baguley, T. Ginsberg und W. Wehrli, Nature, 219 (1968) 1363.

(40) J.T. Madison, Annu. Rev. Biochem. 37 (1968) 131.

(41) R. Thiebe und H.G. Zachau, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 260.

(42) U. Lagerkvist und J. Waldenström, J. Mol. Biol. 8 (1964) 28.

(43) R. Taglang, J.P. Waller, N. Befort und F. Fasiolo, Europ. J. Biochem. 12 (1970) 550.

(44) P. Cerutti und N. Miller, J. Mol. Biol. 26 (1967) 55.

(45) N. Miller und P. Cerutti, J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 2767.

(46) J.B. Macon und R. Wolfenden, Biochemistry, 7 (1968) 3453.

(47) T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem.(im Druck).

(48) F. Pochon, Y. Pascal, P. Pitha und A.M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 213 (1970) 273.

(49) P. Cerutti, J.W. Holt und N. Miller, J. Mol. Biol. 34 (1968) 505.

(50) J.A. Nelson, S.C. Ristow und R.W. Holley, Biochim. Biophys. Acta, 149 (1967) 590.

(51) S.W. Brostow und V.M. Ingram, Science, 158 (1967) 666.

(52) R.D. Batt, J.K. Martin, J.M. Ploeser, J. Murray, J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3663.

(53) M. Molinaro, L.B. Sheiner, F.A. Neelon und G.L. Cantoni, J. Biol.Chem. 243 (1968) 1277.

(54) W.E. Cohn und D.G. Doherty, J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 2863.

(55) H. Feldmann, D. Dütting und H.G. Zachau, Z. Physiol. Chem. 347 (1966) 236.

(57) J.T. Madison, G.A. Everett und H. Kung, Science, 153 (1966) 531.

(58) U.L. RajBhandary, A. Stuart und S.H. Chang, J. Biol. Chem. 243 (1968) 584.

(59) M. Tomasz, Biochim. Biophys. Acta, 199 (1970) 18.

(60) M. Levitt, Nature, 224 (1969) 759.

(61) H.G. Zachau, D. Dütting, H. Feldmann, F. Melchers und W. Karau, Cold Spring Harbor Symp. Quantitat. Biol. 31 (1966) 417.

(62) A.A. Bayev, I. Fodor, A.D. Mirzabekov, V.D. Axelrod und L.Y. Kasarinova, Mol. Biol. (Moskau) 1 (1967) 859.

(63) K. Kasai und M. Grunberg-Manago, Europ. J. Biochem. 1 (1967) 152.

(64) P. Philippsen, Diplomarbeit, Universität München (1968)

(65) K. Chakraburtty und D.P. Burma, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1133.

(66) K. Oda, F. Kimura, F. Harada und S. Nishimura, Biochim. Biophys. Acta, 179 (1969) 97.

(67) F. Cramer, Progr. Nucl. Acid Res. and Molecular Biology, 11 (im Druck).

(68) J. Ninio, A. Favre und M. Yaniv, Nature, 223 (1969) 1333.

(69) P.G. Connors, M. Labanauskas und W.W. Beeman, Science, 166 (1969) 1528.

(70) R. Thiebe und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, 103 (1965) 568.

(71) A.D. Mirzabekov, D. Grunberger, A.I. Krutilina, A. Holy, A.A. Bayev und F. Sorm, Biochim. Biophys. Acta, 166 (1968) 75.

(72) U. Lagerkvist und L. Rymo, J. Biol. Chem. 244 (1969) 2476.

(73) M. Nirenberg und P. Leder, Science, 145 (1964) 1399.

(74) G. Zubay und M. Takanami, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 207.

(75) P. Cerutti, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 (1968) 434.

(76) H.G. Zachau, Nova Acta Leopoldina (im Druck).

(77) M.L. Gefter und R.L. Russell, J. Mol. Biol. 39 (1969) 145.

(78) N. Biezunsky, D. Giveon und U.Z. Littauer, Biochim. Biophys. Acta, 199 (1970) 282.

(79) G.R. Björk und I. Svensson, Europ. J. Biochem. 9 (1969) 207.

(80) R. Thiebe und H.G. Zachau, Biochem. Biophys. Res. Commun. 36 (1969) 1024.

(81) N. Sarkar und D.G. Comb, J. Mol. Biol. 17 (1966) 541; N. Biezunsky, D. Giveon und U.Z. Littauer, Biochim. Biophys. Acta, 199 (1970) 282.

(82) P.D. Lawley und P. Brookes, Biochem. J. 89 (1963) 127.

(83) I.H. Maxwell, E. Wimmer und G.M. Tener, Biochemistry, 7 (1968) 2629.

(84) W. Wintermeyer, R. Thiebe, H.G. Zachau, D. Riesner, R. Römer und G. Maass, FEBS Letters, 5 (1969) 23.

(85) J. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. v. Tigerstrom, E. Wimmer und G.M. Tener, Biochemistry, 6 (1967) 3043.

(86) K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo) 49 (1961) 1.

(87) D. Dütting und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, 91 (1964) 573.

(88) W. Björk, J. Biol. Chem. 238 (1963) 2487.

(89) F. Felix, J.L. Potter und M. Laskowski, sen., J. Biol. Chem. 235 (1960) 1150.

(90) F. Melchers, D. Dütting und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, 168 (1965) 182.

(91) W.E. Razzell, Methods in Enzymology, 6 (1963) 236.

(92) A. Adams, T. Lindahl und J.R. Fresco, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 1684;
T. Lindahl, A. Adams und J.R. Fresco, J. Biol. Chem. 242 (1967) 3129.

(93) B.C. Baguley und M. Staehelin, Biochemistry, 8 (1969) 257.

(94) K. Daneck, G. Weimann und F. Cramer, Experientia, 21 (1965) 417.

(95) H. Gottschling und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, 103 (1965) 418.

(96) G.A. Bray, Anal. Biochem. 1 (1960) 279.

(97) D. Dütting und H.G. Zachau, Z. Physiol. Chem. 336 (1964) 132.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
iA	N-6-Isopentenyl-Adenosin
m^1A	1-Methyladenosin
m^1A^+	1-Methyl-6-Hydroadenosin
m^6A	6-Methyladenosin
BD-	benzoylierte Diäthylaminoäthyl-
C	Cytidin
Cm	2'-Methylcytidin
m^3C	3-Methylcytidin
m^5C	5-Methylcytidin
ac^4C	4-Acetylcytidin
ac^4C^+	3,4,5,6-Tetrahydro-4-Acetylcytidin
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
G	Guanosin
Gm	2'-Methylguanosin
m^1G	1-Methylguanosin
m^2G	2-Methylguanosin
m^2_2G	2-Dimethylguanosin
m^7G	7-Methylguanosin
m^7G^+	7-Methyl-8-Hydroguanosin
m^7G^*	alkalisches Umwandlungsprodukt von m^7G (80)
$m^2_2G>p$	Cyclophosphat der Dimethylguanylsäure
I	Inosin
K_M	Michaelis Konstante
PDE	Phosphodiesterase
PME	Phosphomonoesterase
Rib^+	modifizierte Ribose am 3'-Ende der pG-Hälfte von $tRNA^{Phe}$, wenn die Hälften durch Anilinspaltung von $tRNA^{Phe}$(HCl) gewonnen werden(34,35).
mRNA	Matrizen-Ribonucleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
$tRNA^{Ser}$	Serin-spezifische tRNA (und entspr. andere)
$Ser\text{-}tRNA^{Ser}$	$tRNA^{Ser}$ mit Serin verestert

tRNA-C	tRNA ohne -C-A-Ende
tRNA-C-C-A	tRNA mit vollständigem -C-C-A-Ende (identisch mit tRNA)
$tRNA^{Phe}$(HCl)	$tRNA^{Phe}$ nach Herausspalten der Base von Y durch milde Säurebehandlung(34).
$tRNA^{fMet}$	formylierbare Methionin-spezifische tRNA
T	Tritium
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Uridin
hU	Dihydrouridin
hU^{+}	N-ribosyl-Ureidopropanol
tU	4-Thiouridin
poly U	Polyuridylsäure
poly U,C	Mischkondensationsprodukt aus Uridyl- und Cytidylsäure
Ψ	Pseudouridin
Y	unbekanntes Nucleosid neben dem Anticodon von $tRNA^{Phe}$
Y^{+}	reduziertes Y

Lebenslauf

Am 3. September 1941 wurde ich als erstes Kind des Richters Tibor Igo-Kemenes und seiner Ehefrau Mileva, geborene v. Duka, in Pecs, Ungarn, geboren. Meine Eltern flüchteten im Jahr 1945 nach Deutschland. Die ersten drei Jahre der Grundschule absolvierte ich in Glonn, Kreis Ebersberg /Obb., das vierte Jahr in einem Flüchtlingslager in Waldwerke bei Passau. Von 1951 bis 1960 besuchte ich das staatlich anerkannte "Ungarische Realgymnasium" und legte im Juni 1960 die Reifeprüfung an dieser Schule in Burg Kastl, Kreis Neumarkt/Opf., ab.

Im Wintersemester 1960/61 studierte ich an der Technischen Hochschule München Bauwesen, im Sommersemester 1961 Volkswirtschaft und ab Wintersemester 1961/62 Chemie an der Universität München. Die Diplom-Vorprüfung fand am 12. November 1964, die Diplom-Hauptprüfung am 20. Juli 1967 statt. Nach Beendigung der Diplomarbeit, die am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München unter der Anleitung von Professor Dr. H.G. Zachau durchgeführt wurde, erhielt ich am 1. April 1968 das Diplom für Chemie.

Seit diesem Termin arbeitete ich an meiner Doktorarbeit über das Thema: "Modifizierung von Transfer-Ribonucleinsäuren mit Natriumborhydrid" unter der Anleitung von Professor Dr. H.G. Zachau, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie.